BULLETIN du MUSÉUM NATIONAL d'HISTOIRE NATURELLE

PUBLICATION BIMESTRIELLE

sciences physico-chimiques

6

N° 349 NOVEMBRE - DÉCEMBRE 1975

BULLETIN
du
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

57, rue Cuvier, 75005 Paris

Le *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle*, revue bimestrielle, paraît depuis 1895 et publie des travaux originaux relatifs aux diverses branches de la Science.

Les tomes 1 à 34 (1895-1928), constituant la 1re série, et les tomes 35 à 42 (1929-1970), constituant la 2e série, étaient formés de fascicules regroupant des articles divers.

A partir de 1971, le *Bulletin* 3e série est divisé en six sections (Zoologie — Botanique — Sciences de la Terre — Sciences de l'Homme — Sciences physico-chimiques — Écologie générale) et les articles paraissent, en principe, par fascicules séparés.

S'adresser :

- pour les **échanges**, à la Bibliothèque centrale du Muséum national d'Histoire naturelle, 38, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, 75005 Paris (C.C.P., Paris 9062-62) ;
- pour les **abonnements** et les **achats au numéro,** à la Librairie du Muséum 36, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, 75005 Paris (C.C.P., Paris 17591-12 — Crédit Lyonnais, agence Y-425) ;
- pour tout ce qui concerne la **rédaction**, au Secrétariat du *Bulletin*, 57, rue Cuvier, 75005 Paris.

Abonnements pour l'année 1975

Abonnement général : France, 440 F ; Étranger, 484 F.

Zoologie : France, 340 F ; Étranger, 374 F.

Sciences de la Terre : France, 90 F ; Étranger, 99 F.

Botanique : France, 70 F ; Étranger, 77 F.

Écologie générale : France, 60 F ; Étranger, 66 F.

Sciences physico-chimiques : France, 20 F ; Étranger, 22 F.

International Standard Serial Number (ISSN) : 0027-4070.

BULLETIN DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
3e série, n° 349, novembre-décembre 1975, Sciences physico-chimiques 6

L'acide bourgéanique : nouveau métabolite des Lichens Structure, synthèse et biosynthèse [1]

par Bernard Bodo *

Abstract. — A new lichen substance, bourgeanic acid, has been isolated from several species. Its structure was elucidated on chemical and spectral (^{1}H NMR, ^{13}C NMR, IR, mass spectrometry and X ray analysis) evidences to be 2S, 4R, 6R-trimethyl 3S-(3'S-hydroxy-2'S, 4'R, 6'R trimethyl) octanoyloxy octanoic acid.
This compound appears to be the first aliphatic depside found in Lichens.
A synthesis is given and some chemical properties are studied.
A biosynthetic study shows formation of bourgeanic acid to occur via C-methylation of a polyketide formed by acetate-polymalonate pathway.

SOMMAIRE

1. Thèse de Doctorat d'État ès-Sciences Physiques soutenue le 18 juin 1975 à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.

* *Laboratoire de Chimie appliquée aux corps organisés, Muséum national d'Histoire naturelle, 63, rue de Buffon, 75005 Paris.*

Remerciements

Je remercie très vivement M. le Pr D. MOLHO, Directeur du Laboratoire de Chimie du Muséum national d'Histoire naturelle, pour l'intérêt qu'il a porté à l'ensemble de ce travail, pour les nombreuses et fructueuses discussions à ce sujet et pour sa bienveillance constante à mon égard.

L'étude de la biosynthèse de l'acide bourgéanique a été faite à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, sous la direction de Mme J. POLONSKY. Je la remercie très sincèrement de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir toujours trouvé le temps de me guider et de me conseiller.

J'exprime ma profonde gratitude à Mlle J. FICINI, Professeur, et à MM. les Pr P. MAITTE et J. J. BASSELIER qui ont accepté de juger cette thèse.

Les spectres de RMN du C-13 ont été réalisés par Mme S. COMBRISSON, ceux du proton par M. D. DAVOUST et les spectres de masse par M. J. RIVIÈRE. La structure cristalline a été analysée par Mme C. PASCARD-BILLY et M. J. GUILHEM.

C'est avec reconnaissance que j'associe à ces remerciements M. le Pr R. HEIM, Membre de l'Institut, Mme S. JOVET-AST, Professeur au Muséum, M. le Pr H. C. BROWN, Mmes M.-A. LETROUIT-GALINOU, H. BENOIST, Mlle A. MERRIEN, MM. J. ANDRIEUX, DORME, P. JOSSANG, et tous mes camarades et amis des Laboratoires du Muséum et de Gif-sur-Yvette qui, à des titres divers, m'ont apporté une aide très précieuse au cours de ces recherches.

> *Yet natural products continue to hold a unique fascination not only because of their relationships to the organisms from which they are derived, not only because plants that can photosynthesize possess synthetic power that far surpasses that of man, not only because of their potential usefulness to man in their natural form or as templates for synthetic analogs, but chiefly because each new structural type reveals something of nature's molecular architecture and poses new questions of how and why these compounds are being produced.*
>
> P. J. Scheuer.

INTRODUCTION

Depuis longtemps les « substances des lichens » ont attiré l'attention des chimistes et, dès 1907, Zopf (**1**) publiait une monographie, « Die Flechtenstoffe », sur ce groupe de produits naturels. En effet, si certaines de ces substances sont aussi synthétisées par les Champignons et les plantes supérieures, la plupart sont caractéristiques des Lichens. Plus récemment l'intérêt s'est accru par la découverte de l'activité biologique de certaines d'entre elles et par leur utilité pour l'identification et la classification des quelque 20 000 espèces de Lichens connues.

Nature des Lichens

Les Lichens (**2**, **3**, **4**, **5**) sont des organismes complexes résultant de l'association de deux végétaux. L'un des constituants est chlorophyllien : ce peut être une Algue bleue (Cyanophyte) ou, et c'est le cas le plus fréquent, une Algue verte (Chlorophyte). L'autre constituant est un Champignon supérieur qui appartient presque toujours à la classe des Ascomycètes.

Cet état de symbiose fait que les Lichens possèdent certains des caractères de leurs composants et d'autres qui leur sont propres, tant du point de vue botanique, que biochimique ou écologique.

Ce sont des végétaux cosmopolites pouvant se développer même dans des conditions climatiques très difficiles où toute autre forme de végétation est impossible : c'est le cas des zones arctiques et des régions de haute altitude où les Lichens constituent l'essentiel de la Flore. Ils se fixent sur les supports les plus variés : roches, terre, écorces et feuilles d'arbre, mousses... Certains même, comme *Lecanora esculenta*, sont erratiques.

Ils ne sont pas, comme certains auteurs l'ont supposé, une des premières formes de vie, mais ils ont un rôle de pionnier dans la végétation. Leurs besoins modestes, et leur faculté de concentrer les éléments qui leur sont nécessaires à partir de l'air et de l'eau de pluie, leur permettent de coloniser des territoires inhospitaliers à la végétation. En contrepartie, la disparition des Lichens des zones industrielles et urbaines est partiellement due à ce phénomène : ils accumulent les gaz toxiques comme l'anhydride sulfureux à des doses mortelles et peuvent être, de ce fait, utilisés comme indicateurs de pollution. Par ailleurs, ils concentrent les produits de retombées radioactives, polluant ainsi une chaîne alimentaire qui va jusqu'à l'homme.

Parmi les autres particularités des Lichens, nous noterons leur croissance très lente (l'accroissement annuel des thalles varie de 0,1 à 20 mm en moyenne) et leur étonnante longévité : les Lichens centenaires sont nombreux et l'on connaît même certains spécimens ayant plusieurs milliers d'années.

Usage des Lichens

Les Lichens ont été utilisés occasionnellement comme aliment par l'homme, mais certains grands Lichens, comme les *Cetraria* ou les *Cladonia*, fournissent la base de l'alimentation pour de nombreux mammifères du Grand Nord, en particulier pour les rennes.

Différentes pharmacopées populaires ont utilisé depuis l'antiquité des Lichens, souvent pour des raisons illusoires : un Lichen jaune (*Xanthoria parietina*) était recommandé pour le traitement de la jaunisse et *Lobaria pulmonaria*, à cause d'une apparence extérieure, pour les maladies pulmonaires.

On a pu cependant montrer que certaines substances des Lichens avaient une action antibiotique réelle : c'est le cas, par exemple, de l'acide usnique actif contre le bacille de la tuberculose et commercialisé sous le nom « Usno ». Par ailleurs, Fusikawa (**6**) a remarqué des propriétés antiseptiques notables pour les depsides et les depsidones.

Les usages industriels ont concerné l'obtention de matières colorantes (orseilles), industrie naguère florissante, et la fabrication de fixateurs de parfums. C'est là la seule utilisation industrielle qui soit encore importante. Notons enfin que l'indicateur de pH appelé tournesol est obtenu à partir de divers Lichens des genres *Roccella* et *Lecanora*.

Les substances lichéniques

Les Lichens accumulent jusqu'à des taux souvent considérables les métabolites qu'ils synthétisent. La raison de cette accumulation est encore mystérieuse. Plusieurs hypothèses ont été avancées : — protection de l'algue contre les radiations lumineuses, — protection contre les prédateurs (insectes) et l'envahissement par des bactéries ou d'autres champignons, — contrôle du développement réciproque des partenaires de la symbiose, — modification de la perméabilité des parois cellulaires pour faciliter les échanges entre les symbions, — rôle d'agents chélatants pour capter les éléments métalliques du milieu...

Les structures de plus de 200 de ces métabolites ont été établies à l'heure actuelle. Leurs propriétés et leur répartition ont été décrites en détail dans plusieurs ouvrages récents par Asahina et Shibata (**7**), Culberson (**8**, **9**), Huneck (**10**, **11**) et Mosbach (**12**).

Leur nature chimique est très variée et nous n'allons donner qu'un bref aperçu des grands groupes de composés rassemblés sur la base de leur biogenèse.

A. — Produits du métabolisme primaire

1. **Polyols et carbohydrates**

Les polyols et carbohydrates des Lichens sont issus de l'activité photosynthétique de l'Algue et plus ou moins transformés par le Champignon. Les polyols les plus répandus

sont le D-arabitol, le meso-érythrytol et le mannitol. Les Lichens produisent différents mono- et disaccharides communs aux plantes de façon générale et quelques polysaccharides particuliers comme la lichénine. Certains polysaccharides des Lichens possèdent une activité anticancéreuse et sont actuellement l'objet d'études poussées.

2. Composés azotés

Les Lichens renferment des acides aminés semblables à ceux des autres plantes. Deux cyclopeptides ont été isolés : la picroroccelline de *Roccella fuciformis* et la roccanine de *Roccella canariensis*.

B. — Produits du métabolisme secondaire

1. Substances biosynthétisées par la voie acétique-polymalonique

a — *Acides et lactones aliphatiques*

Les Lichens biosynthétisent une série d'acides et d'acides-lactones par condensation d'un acide gras linéaire à longue chaîne (acide palmitique) avec une unité à quatre atomes de carbone (acide oxalacétique) issue du cycle tricarboxylique. On peut citer comme exemples-types les acides rangiformique I et protolichestérinique II.

I

II

Des acides aliphatiques semblables ont été isolés dans des Champignons non lichénisants : acide spiculisporique de *Penicillium spiculisporum* et acide agaricique de *Fomes officinalis*.

b — *Composés aromatiques*

1 — Pigments

La coloration jaune ou orangée de nombreux Lichens est due à la présence de naphtoquinones, d'anthraquinones comme la pariétine III pour les genres *Xanthoria* et *Caloplaca*, ou de xanthones comme la norlichéxanthone IV de *Lecanora straminea*.

Ces composés sont formés *in vivo* par cyclisation d'une chaîne poly-β-cétonique.

III

IV

2 — Benzofurannes

On connaît plusieurs substances ayant un squelette benzofuranne, c'est le cas de l'acide pannarique V ou de l'acide usnique VI. Celui-ci, optiquement actif, est très répandu chez les Lichens.

V VI

L'acide pannarique est formé par une cyclisation du type orsellinique du précurseur poly-β-cétonique, alors que l'acide usnique est formé par une cyclisation du même précurseur du type phloroglucinol après méthylation.

3 — Depsides et depsidones

Les depsides et les depsidones sont les composés les plus communs des Lichens, puisqu'on en a isolé et caractérisé plus de soixante-dix. Les depsides sont constitués par l'estérification intermoléculaire de deux ou trois acides phénoliques. Ceux-ci peuvent être de deux types, A ou B, selon qu'ils se rattachent à l'acide orsellinique VII ($R = CH_3$) ou à l'acide méthyl-3 orsellinique VIII ($R' = CH_3$).

VII VIII

Le radical R, dans le cas des unités du type A, peut être un méthyle ou une chaîne aliphatique : C_3H_7, C_5H_{11}, C_5H_{15}. Ces unités, comme nous le verrons plus en détail au chapitre III, proviennent de la cyclisation d'une chaîne poly-β-cétonique.

Le radical R', dans le cas des unités du type B, est toujours monocarboné à un degré d'oxydation variable : méthyle, formyle... Il est introduit par C-méthylation de la chaîne poly-β-cétonique avant sa cyclisation.

On distingue deux groupes de depsides, selon que la liaison ester relie la première unité à une position de la deuxième unité en *para* ou en *méta* de sa fonction carboxyle. Le tableau suivant donne un exemple de chaque groupe.

TYPE	para-depsides	meta-depsides
A	Ac. divaricatique	Ac. sékikaique
B	Atranorine	Ac. thamnolique

Remarquons que la formation des *para*-depsides est obtenue par simple estérification, alors que celle des *méta*-depsides inplique une hydroxylation nucléaire puisqu'il n'y a pas d'hydroxyle en *méta* du carboxyle dans les unités orselliniques.

Dans certains cas il y a intervention d'une troisième et d'une quatrième unité pour conduire aux tridepsides et tétradepsides respectivement.

Les depsidones proviennent vraisemblablement de la cyclisation oxydative des depsides, mais seules quelques-unes ont pu être rattachées à des depsides connus. Elles peuvent être reliées biogénétiquement, comme les depsides, soit à l'acide orsellinique (acide physodique IX, par exemple), soit à l'acide méthyl-3 orsellinique (acide hypoprotocétrarique X, par exemple).

Pour toutes les depsidones connues sauf une, dont d'ailleurs la structure est douteuse, la fonction ester est en *para* de la fonction acide.

IX X

Les autres depsides et depsidones correspondent à des variations des degrés d'O-méthylation, d'oxydation, de chloruration et de décarboxylation des exemples cités.

2. Dérivés de l'acide mévalonique

On ne connaît qu'un diterpène chez les Lichens : le 16α-hydroxykaurane XI, isolé de plusieurs *Ramalina*. Notons que le (—) kaurène, produit de déshydratation de ce composé est le précurseur des acides gibbérelliques.

XI XII

Les triterpènes sont plus répandus puisqu'on en a caractérisé une vingtaine, leur structure dérive pour la plupart d'entre eux de l'hopane. La zéorine XII en est le plus commun.

Trois stérols seulement ont été isolés : l'ergostérol, le fungistérol et le β-sitostérol.

Enfin, le β-carotène a été mis en évidence dans plusieurs espèces de *Roccella*.

Le petit nombre de composés d'origine isoprénique trouvé dans les Lichens s'explique vraisemblablement par une recherche insuffisante.

3. Dérivés de l'acide shikimique

Cette classe de composés chimiques est représentée par quelques corps, tous très colorés. Ils proviennent de l'acide shikimique par l'intermédiaire de l'acide phénylpyruvique. Nous ne citerons que l'acide polyporique XIII, connu par ailleurs chez les Champignons, et l'acide pulvinique XIV, qui en dérive et qui est le chef de file d'une série.

XIII XIV

De cet examen rapide des substances lichéniques on peut conclure que ce groupe végétal synthétise essentiellement des composés aromatiques.

Au cours d'une recherche systématique des constituants chimiques de Lichens du genre *Ramalina* nous avons isolé une substance aliphatique de structure inconnue, présentant les caractères d'un acide organique, que nous avons proposé de nommer acide bourgéanique. Ce nouveau composé, qui semble avoir une large répartition, s'est révélé être le premier « depside » aliphatique des Lichens.

Nous décrivons, dans cet exposé, l'établissement de sa structure par des fragmentations chimiques et l'utilisation des méthodes spectroscopiques. La synthèse de l'acide bourgéanique et l'examen de ses propriétés chimiques nous ont permis de déduire sa structure spatiale, qui a été confirmée par son spectre de rayons X. Plusieurs hypothèses pouvant être envisagées pour sa synthèse *in vivo*, nous avons étudié, à l'aide des traceurs radioactifs, par quelle voie cet acide était formé dans la nature.

I. STRUCTURE PLANE DE L'ACIDE BOURGÉANIQUE

A. — Isolement et répartition

L'acide bourgéanique est produit par plusieurs espèces de Lichens appartenant à des familles différentes. Nous ne décrirons l'isolement que dans le cas de *Desmaziera evernioides* et de *Ramalina bourgeana*, qui nous ont fourni la matière nécessaire à cette étude. Ce faisant nous signalerons les autres substances de structures connues présentes dans ces plantes.

1. **Analyse des extraits de** *Desmaziera evernioides* (Nyl.) Foll. et Hun.

Desmaziera evernioides est une espèce classée dans la famille des Ramalinacées, et le genre *Desmaziera* a été créé récemment à partir du genre *Ramalina*. Le mycobion est un Ascomycète et le phycobion appartient au genre *Trebouxia*, comme pour tous les Lichens de cette famille.

C'est un Lichen foliacé, polymorphe, dont le thalle vert clair à lanières varie de 1 à 5 cm. Il peut se développer aussi bien sur les vieux murs que sur l'écorce des arbres. On le rencontre sur les côtes d'Europe, d'Afrique et d'Amérique, dans les régions ventées où l'humidité atmosphérique est abondante.

On n'a pas décrit de propriétés ou d'usages particuliers de ce Lichen, cependant Werner (**13**) a remarqué que « les jeunes exemplaires croissant sur les feuilles d'*Agave* ou les raquettes d'*Opuntia* au Maroc étaient relativement axéniques, alors que ces substrats portent ordinairement de nombreux microorganismes étrangers ».

Une étude chimiotaxonomique n'a pas fait apparaître de différences entre des exemplaires provenant d'Irlande, de Bretagne ou des îles Baléares. Par ailleurs, nous avons pu vérifier que des spécimens de *Desmaziera evernioides*, conservés depuis cent ans dans l'herbier du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris, renfermaient toujours l'acide bourgéanique. Le travail décrit ici a été effectué avec un lot récolté sur les bords du golfe du Morbihan où ce Lichen est commun.

Méthode d'extraction

Le Lichen, séché à l'air et broyé, est extrait en continu au Soxhlet successivement par de l'hexane et de l'éthanol.

L'extrait hexanique fournit, après cristallisation dans l'hexane, traitement par du noir végétal et recristallisation dans le mélange méthanol-eau, l'acide bourgéanique *1* (**14**) en aiguilles incolores fondant à 125-126°C. 100 g de Lichen sec permettent d'isoler environ 3 g de cette substance (teneur : 3 %). La chromatographie sur couche mince confirme la présence d'un seul produit : Rf = 0,5 (gel de silice ; éluant : acide acétique-toluène, 15/85). Le chromatogramme est révélé par pulvérisation d'une solution de bichromate de sodium dans l'acide sulfurique concentré, suivie du chauffage de la plaque.

En solution dans le chloroforme, l'acide bourgéanique présente un pouvoir rotatoire

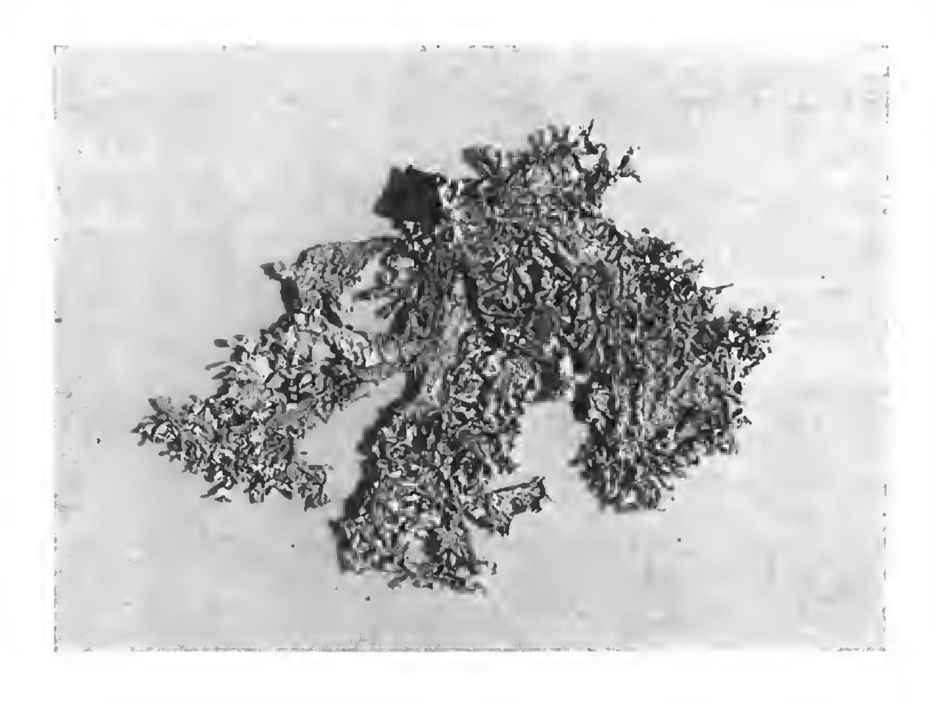


FIG. 1. — *Desmaziera evernioides.*

spécifique : $[\alpha]_D^{21} = +7^o$ (c = 1,003).

L'extrait éthanolique renferme différentes substances et il a été possible d'isoler par cristallisation fractionnée :

— Du D-arabitol *2*, F : 102-103°C (Litt. 102-103°C) (teneur : 0,55 %). Cet itol est répandu chez les Lichens des familles Ramalinacées et Usnéacées.

CH_2OH
HO—C—H
H—C—OH
H—C—OH
CH_2OH

2

$(CH_3)_3\overset{+}{N}-CH_2-CH_2-OSO_3^-$

3

— Du sulfate de choline *3*, F : 300°C (teneur : 0,16 %). Cette substance n'a été signalée jusqu'à présent que dans peu d'espèces (en particulier dans *Roccella fuciformis*) (**15**).

— Un mélange d'acides gras analogues à l'acide ventosique *4* (**16**). Ces acides se trouvent dans de nombreuses espèces de Lichens et leur structure n'est pas établie. Ils sont actuellement considérés comme des acides à longues chaînes tétrahydroxylées.

$$CH_3-(CH_2)_{28}-\underset{OH}{CH}-\underset{OH}{CH}-CH_2-\underset{OH}{CH}-\underset{OH}{CH}-(CH_2)_{28}-COOH$$

4

2. **Analyse des extraits de** *Ramalina bourgeana* Mont.

Les échantillons de ce Lichen saxicole, halophile, que nous avons examinés provenaient des îles Canaries. On le rencontre, en outre, dans la région occidentale du bassin méditerranéen, au Portugal et au Maroc. Son aire géographique ne s'éloigne pas des bords de mer.

Il s'agit d'un Lichen foliacé, polymorphe, dont le thalle jaune-vert porte le plus souvent de nombreuses apothécies. TROTET (**17**) signale, à titre de curiosité, que *Ramalina bourgeana*, qui se développe grâce à l'humidité des brouillards côtiers dans des régions du Sahara occidental proches de la mer, y sert de pâturage pour les moutons.

L'extrait acétonique de ce Lichen est repris par de l'hexane. De la fraction soluble dans l'hexane on isole d'abord, par refroidissement, l'acide (+) usnique *5*, en petites aiguilles jaunes fondant à 200-202°C [Litt. 203°C (**18**, **19**)], puis après concentration du solvant, l'acide bourgéanique (la teneur est de 0,4 %). La fraction insoluble dans l'hexane donne l'acide salazinique *6* (**20**), en microcristaux blancs fondant vers 260-280°C avec décomposition.

5 6

Enfin, l'extrait éthanolique fournit du mannitol *7* [F : 164-167°C, Litt. 166-167°C (**8**)] et des acides gras tétrahydroxylés comme dans le cas précédent.

Ces Lichens avaient été auparavant examinés par HUNECK (**21**) qui signalait la présence d'une substance inconnue fondant à 120-121°C et qui s'est révélée être l'acide bourgéanique.

3. **Répartition**

La répartition de l'acide bourgéanique chez les Lichens est à l'étude et nous donnons la liste des espèces dans lesquelles il a été actuellement rencontré.

Lichens contenant l'acide bourgéanique	Origine	Autres substances
Desmaziera evernioides	Europe occid.	Sulfate de choline
Desmaziera ceruchis	Californie	
Desmaziera testudinaria	Californie	
Desmaziera inanis	Pérou	
Ramalina bourgeana	Iles Canaries	Ac. usnique, ac. salazinique
Ramalina leptocarpa (**22**)	Californie	Ac. usnique (**21**)
Ramalina tingitana (**23**)	Iles Canaries	Ac. usnique
Cladonia conista (**24**, **25**)	Connecticut	Ac. fumarprotocétrarique (**26**)
Stereocaulon tomentosum (**27**)	Norvège	Atranorine, ac. lobarique
Usnea florida ssp (**28**)	Floride	Ac. usnique, ac. salazinique

B. — Détermination de la formule brute

Le spectre de masse de l'acide bourgéanique fait apparaître le pic de masse la plus élevée à m/e = 387 (0,2 %), et la haute résolution attribue pour l'ion correspondant la formule brute $C_{22}H_{43}O_5$ (Calc. 387,311 Tr. 387,310). L'analyse élémentaire ne montrant la présence que de carbone, d'hydrogène et d'oxygène dans la molécule, cet ion de masse impaire ne représente pas l'ion moléculaire.

Le dosage de cet acide conduit à une masse de 386 ± 1 pour une fonction acide et les résultats de l'analyse centésimale sont en accord avec la formule brute $C_{22}H_{42}O_5$.

Les réactions de capture d'un proton par l'ion moléculaire, en spectrométrie de masse, se rencontrent habituellement dans le cas de substances possédant des fonctions nucléophiles telles que des groupes carbonyles, polyhydroxyles ou acides carboxyliques, et l'on observe alors des ions $(M + H)^+$ intenses (**29**). Ce phénomène a été décrit, par exemple, pour les acétates de monosaccharides (**30**). Par ailleurs, Polonsky (**31**) observe aussi l'ion moléculaire augmenté d'une unité de masse dans le cas du boronolide, composé qui renferme huit atomes d'oxygène.

En résumé, l'acide bourgéanique, nouveau métabolite de plusieurs Lichens, est un solide fondant à 125-126°C, il est optiquement actif $\left([\alpha]_D^{21} = +7^\circ \right)$, *et a pour formule brute :* $C_{22}H_{42}O_5$.

C. — Détermination et positions relatives des groupes fonctionnels

Le spectre infrarouge, effectué en pastille dans le bromure de potassium, montre la présence de fonctions : hydroxyle (ν_{OH} = 3420 cm^{-1}), ester ($\nu_{C=O}$ = 1740 cm^{-1}) et acide ($\nu_{C=O}$ = 1720 cm^{-1}). La zone de vibration des C-H est en faveur d'une structure aliphatique à ramifications méthyles nombreuses. En effet, on observe des maximums d'absorption à ν = 2960 et 2870 cm^{-1} intenses, correspondant à des vibrations C-H de groupes méthyles.

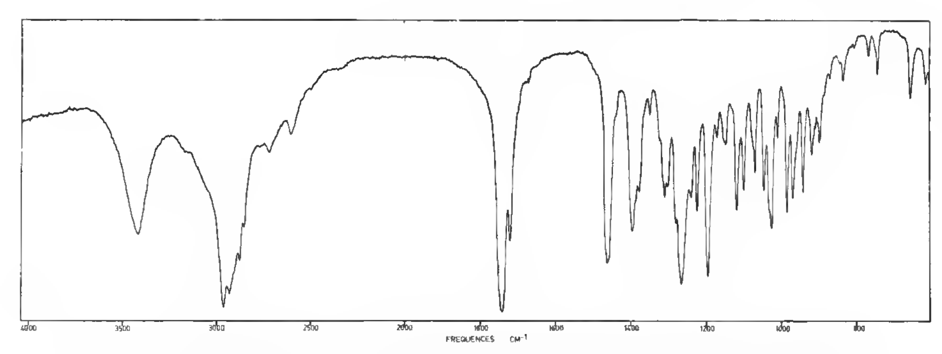


Fig. 2. — Spectre infrarouge de l'acide bourgéanique *1* (pastille de KBr).

Les deux insaturations déduites de la formule brute $C_{22}H_{42}O_5$ sont utilisées par les deux carbonyles : la molécule n'est donc ni cyclique, ni éthylénique. Ce dernier point est d'ailleurs confirmé par le spectre infrarouge qui ne présente pas d'absorption correspondant à des liaisons C = C.

La répartition des 42 protons de l'acide bourgéanique dans son spectre de résonance magnétique nucléaire ($CDCl_3$, T.M.S en réf.int.) est consignée dans le tableau suivant :

δ ppm	Nombre de protons	Allure	
6,77	2H	s large	OH (COOH + OH)
5,23	1H	d de d $J_1 = 2,5$ $J_2 = 10$	$>$CH — O — CO
3,75	1H	d de d $J'_1 = 2,5$ $J'_2 = 10$	$>$C*H* — O — H
2,72	2H	m	2 $>$CH — CO—
0,70 à 2	36H	massif	

L'étude des couplages et le découplage de spin permettent d'apporter quelques précisions supplémentaires pour les protons qui se différencient du massif aliphatique.

Nous avons considéré les deux protons donnant un signal à 2,72 ppm comme étant en α d'un carbonyle du fait de leurs déplacements chimiques. Si l'on irradie ces protons, on observe une simplification du spectre : le proton donnant un signal à 5,23 ppm ne présente plus qu'un doublet ($J_1 = 2,5$ Hz), de même que celui résonnant à 3,75 ppm ($J_1 = 2,5$ Hz).

Par ailleurs, si l'on irradie les protons situés vers 1,5 ppm, que l'on peut considérer comme des protons tertiaires, on observe la résolution des signaux des protons situés à 5,23 et 3,75 ppm en deux doublets (J = 10 Hz).

On peut déduire logiquement de ces résultats la présence dans la molécule de deux systèmes :

```
                R
                |
        C       O       C
        |       |       |
 — C — C ——— C ——— C — CO —
        |       |       |
        H       H       H
```

avec pour l'un : R = H, et pour l'autre : R = -CO-.

Le fait d'avoir montré que la molécule n'avait que deux insaturations correspondant à deux carbonyles, l'un acide, l'autre ester, exclut la présence de carbonyles supplémentaires et ne laisse donc pas d'autre possibilité que l'enchaînement suivant, qui utilise les cinq atomes d'oxygène de la formule brute :

```
                                         COOH
                                          |
       C      OH     C               C — C — H
       |      |      |                    |
 C — C ——— C ——— C ——— CO — O ——— C — H
       |      |      |                    |
       H      H      H               C — C — H
                                          |
                                          C
```

Nous avons déterminé ainsi l'environnement des carbones fonctionnels. Il ne reste plus qu'à préciser la position des 22 — 8 = 14 atomes de carbone restant dans la molécule.

Mais, auparavant, quelques réactions chimiques simples vont confirmer les hypothèses avancées jusqu'ici.

Réactions confirmant la présence d'une fonction acide

Formation de sels

L'acide bourgéanique se dissout lentement dans une solution aqueuse de bicarbonate de potassium. Le sel de potassium *8* formé précipite immédiatement. On obtient une réaction plus rapide et plus complète en opérant de la façon suivante : à une solution concentrée d'acide bourgéanique dans l'éthanol, on ajoute une solution aqueuse de potasse et le sel de potassium formé précipite. C'est un solide blanc, fondant à 251°C avec décomposition. Il est peu soluble dans l'eau et très soluble dans l'éthanol. Son spectre infrarouge montre une fonction carbonyle $\nu_{C=O}$ = 1712 cm^{-1} et une fonction carboxylate ν_{COO^-} = 1590 cm^{-1}.

Ester méthylique

Traité par une solution éthérée de diazométhane, l'acide bourgéanique conduit à un ester monométhylique *9*, qui se présente sous la forme d'un liquide huileux. Son spectre infrarouge montre la présence d'hydroxyle (ν_{OH} = 3450 cm^{-1}), et une large bande carbonyle ($\nu_{C=O}$ = 1745 cm^{-1}).

En spectrométrie de masse, comme dans le cas de l'acide bourgéanique, on n'observe pas l'ion moléculaire M^+, mais l'ion $(M + H)^+$ à m/e = 401. Ceci représente un gain de 14

unités de masse par rapport à l'acide bourgéanique : il s'agit donc bien d'une monométhylation.

Ce résultat est, en outre, confirmé par le spectre de RMN de l'ester *9* ($CDCl_3$), qui présente un signal à 3,70 ppm (singulet, 3H) correspondant à un seul -OCH_3.

Réactions confirmant la présence d'une fonction alcool secondaire

Acétylation

L'acide bourgéanique se dissout à froid dans le chlorure d'acétyle. Par élimination de l'excès de ce réactif et purification par chromatographie sur plaque de gel de silice, on isole l'acide acétylbourgéanique *10*, qui se présente sous la forme d'un liquide huileux.

Son spectre infrarouge montre qu'il s'agit d'un acétate ($\nu_{C=O}$ = 1790 cm^{-1}) et son spectre de RMN précise que c'est un monoacétate, puisqu'on observe un signal à 2,03 ppm correspondant à un seul O-CO-CH_3.

Oxydation

L'oxydation chromique de l'acide bourgéanique, en solution dans l'acide acétique vers 50°C, conduit à un composé cétonique *11* : l'examen de son spectre infrarouge montre la disparition de la bande d'absorption due à l'hydroxyle ; on observe des bandes d'absorption carbonyle à 1740 et 1710 cm^{-1}.

En spectrométrie de masse, l'ion de masse la plus élevée à m/e = 385 correspond à l'ion moléculaire augmenté d'une unité, ce qui entraîne pour le composé *11* la formule brute $C_{22}H_{40}O_5$. Il y a donc perte de deux atomes d'hydrogène par rapport à la formule de l'acide bourgéanique.

Enfin, le signal attribué au groupe -CHOH- disparaît dans le spectre de RMN.

Ces résultats confirment la nature secondaire de la fonction alcool.

D. — Réactions de fragmentation

1. Hydrolyse alcaline

L'hydrolyse alcaline de l'acide bourgéanique ne conduit qu'à un seul produit *12*. C'est un liquide incolore, bouillant à 154°C sous 0,9 mm de pression. Il présente un pouvoir rotatoire spécifique de $[\alpha]_D^{21} = -3{,}2°$ ($CHCl_3$).

Son spectre infrarouge (lames KBr) indique qu'il s'agit d'un acide-alcool, l'hydroxyle absorbant à ν_{OH} = 3420 cm^{-1} et le carboxyle $\nu_{C=O}$ = 1715 cm^{-1}.

Par action du bromure de *para*-phénylphénacyle, il donne un dérivé cristallisé (le *p*-phénylphénacylate) *13* fondant à 80-81°C (MeOH/H_2O).

Le spectre de RMN ($CDCl_3$) de cet acide *12* se présente de la façon suivante :

δ ppm	Nombre de protons	Allure	
7,50	2H	s large	OH + COOH
3,72	1H	d de d $J_{H\alpha,\,H\beta} = 8{,}5$ Hz $J_{H\beta,\,H\gamma} = 2{,}5$ Hz	> CH_β — OH
2,71	1H	d de q $J_{H\alpha,\,H\beta} = 8{,}5$ Hz Jq = 7 Hz	> CH_α — CO
0,80 à 2	18H	massif	

Le déplacement chimique du proton H_α montre qu'il est en α d'un carbonyle. Le découplage de spin révèle qu'il est couplé avec le proton H_β ($J_{H\alpha,H\beta} = 8{,}5$ Hz) d'une part et, avec un méthyle ($J_q = 7$ Hz) situé vers 1,2 ppm d'autre part. Le déplacement de ce méthyle vers les champs faibles s'explique par sa position en β du carbonyle.

Le proton H_β, couplé avec le proton H_α, est de plus couplé avec un autre proton tertiaire H_γ ($J_{H\beta,H\gamma} = 2{,}5$ Hz), ce qui permet de compléter l'enchaînement :

C—C(C)(Hγ)—C(OH)(Hβ)—C(CH₃)(Hα)—COOH

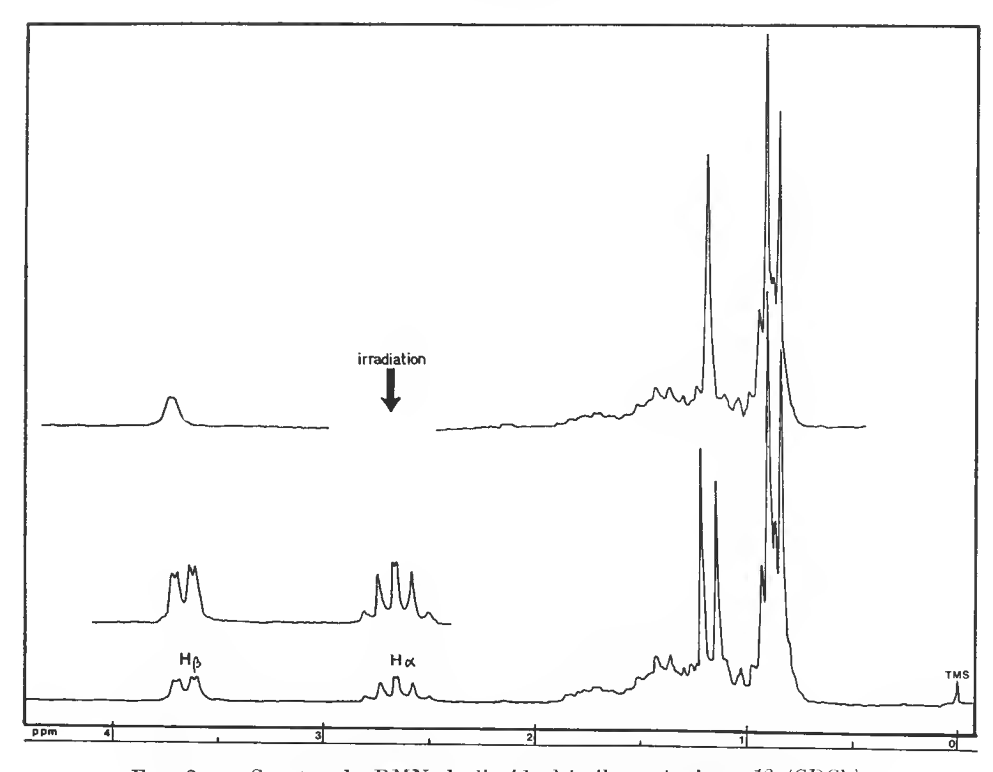


Fig. 3. — Spectre de RMN de l'acide hémibourgéanique *12* ($CDCl_3$).

Le système, que nous avons décrit précédemment pour l'acide bourgéanique, est retrouvé, et la nature de la ramification en α du carboxyle est précisée, puisqu'il s'agit d'un méthyle.

Le spectre de masse de cette substance *12* fait apparaître un ion moléculaire M^+ à m/e = 202, correspondant à la formule brute : $C_{11}H_{22}O_3$.

Le fait que l'hydrolyse de l'acide bourgéanique ($C_{22}H_{42}O_5$) ne conduise qu'à un seul composé ($C_{11}H_{22}O_3$) comportant une fonction acide et une fonction alcool, implique qu'il est constitué par l'estérification d'une molécule de cet acide en C_{11} par une deuxième. Nous pouvons écrire le schéma :

1 → 2 × 12

$R_1 = CH_3$ $R_2 + R_3 = C_6H_{14}$

Pour des raisons de commodité, nous appellerons cet acide *12* : acide hémibourgéanique.

Analyse du spectre de masse de l'acide hémibourgéanique 12

On sait que les acides ou leurs esters subissent sous l'impact électronique un clivage entre les carbones en 2 et en 3, avec réarrangement d'un atome d'hydrogène pris au carbone en 4. McLafferty a proposé pour cette fragmentation un intermédiaire cyclique, qui aboutit à la formation d'une oléfine neutre et d'un ion carbonium intense.

Les substituants alkyles du carbone en α du carboxyle vont se retrouver dans l'ion formé : un ion abondant à m/e = 74 sera significatif de la présence d'un substituant méthyle en 2.

m/e = 74

Le pic de base du spectre du composé en C_{11} est à m/e = 74 et doit être attribué à l'ion $[CH_3 - CH = C(OH)_2]^{+\cdot}$. (Ceci confirme bien que cet acide est α-méthylé ($R_1 = CH_3$).

Toutefois, puisqu'il s'agit d'un acide β-alcool, un autre mécanisme peut être proposé pour la formation de cet ion faisant intervenir l'hydroxyle.

Etemadi (**32**) explique, de cette façon, la formation de l'ion m/e = 116 (100 %) dans le spectre de masse de l'éthyl-2 hydroxy-3 nonanoate d'éthyle, et précise en outre qu'il ne s'agit pas d'un phénomène de pyrolyse préalable. En effet, le pic de base à m/e = 43 dans le spectre de masse du butyrate d'éthyle (masse moléculaire 116) est environ vingt fois plus intense que celui de l'ion moléculaire (m/e = 116), ce qui n'est pas observé dans le spectre du nonanoate étudié.

$$\left[C_6H_{13}-CH(OH)-CH(C_2H_5)-COOC_2H_5\right]^{+\cdot} \longrightarrow \left[CH_2(C_2H_5)-COOC_2H_5\right]^{+\cdot} \quad m/e = 116\ (100\%)$$

Nous avons pu prouver que la fragmentation s'effectue par le deuxième mécanisme impliquant l'hydroxyle, en remplaçant l'atome d'hydrogène de celui-ci par un atome de deutérium. Cet isotope se retrouve presque intégralement dans l'acide propionique formé ($\geqslant$ 95 % aux erreurs de mesures près).

Les substances portant un hydroxyle subissent des fragmentations par rupture des liaisons de part et d'autre de cette fonction (**33**) :

$$\left[R-CH_2 \vdots CHOH \vdots CH_2-R'\right]^{+\cdot} \longrightarrow \begin{cases} R-CH_2-CHOH^+ \\ R'-CH_2-CHOH^+ \end{cases}$$

C'est de cette façon que se forment les ions à m/e = 129 et 103. Ils perdent ultérieurement chacun une molécule d'eau pour former respectivement les ions m/e = 111 et m/e = 85.

L'ion moléculaire conduit, par perte d'une molécule d'eau, à l'ion m/e = 184, qui se fragmente ensuite en éliminant le radical C_2H_5 pour former l'ion m/e = 155.

L'ensemble des fragmentations de l'acide *12* est explicité dans le schéma suivant :

$$\left[(R_2)(R_3)CH-CHOH-CH(CH_3)-COOH\right]^{+\cdot}\ (m/e: 202)$$

- $\xrightarrow{-H_2O}$ $C_{11}H_{20}O_2^{+\cdot}$ (m/e: 184) $\xrightarrow{-C_2H_5^{\cdot}}$ $C_9H_{15}O_2^+$ (m/e: 155)
- $\longrightarrow$ $\overset{+\cdot}{C}OOH-CH_2-CH_3$ (m/e: 74)
- $\longrightarrow$ $(R_2)(R_3)CH-CH=\overset{+}{O}H$ (m/e: 129) $\xrightarrow{-H_2O}$ $C_8H_{15}^+$ (m/e: 111)
- $\longrightarrow$ $^+OH=CH-CH(CH_3)-COOH$ (m/e: 103) $\xrightarrow{-H_2O}$ $C_4H_5O_2^+$ (m/e: 85)

$R_2 + R_3 = C_6H_{14}$

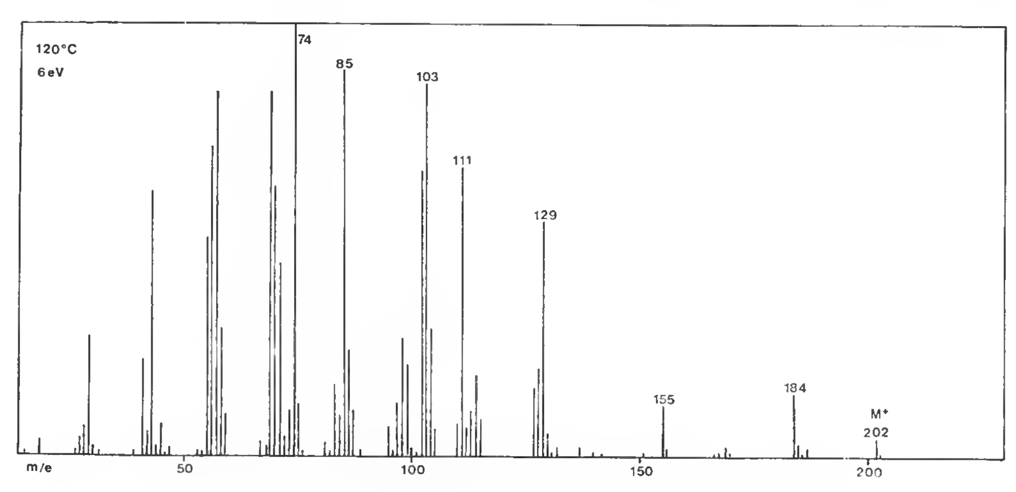


Fig. 4. — Spectre de masse de l'acide hémibourgéanique *12*.

Ester méthylique de l'acide hémibourgéanique

Traité par le diazométhane l'acide *12* est converti en son ester méthylique *14*. C'est un liquide mobile, ayant un pouvoir rotatoire de $[\alpha]^{23}_{D} = + 6°$ ($CHCl_3$, c = 1,07). En infrarouge l'hydroxyle absorbe à 3520 cm^{-1}, et le carbonyle apparaît sous la forme de deux bandes à 1720 et 1735 cm^{-1}. Le méthoxyle apparaît à 3,70 ppm (s, 3H) dans le spectre de RMN. On observe l'ion moléculaire à m/e = 216 ($C_{12}H_{24}O_3$) en spectrométrie de masse et la fragmentation est analogue à celle de l'acide *12*.

$$(C_6H_{14})CH-\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}-COOCH_3$$

2. Fragmentation thermique

Nous avons vu précédemment que le sel de potassium de l'acide bourgéanique subissait une décomposition lors de sa fusion. Si on le pyrolyse à une température proche de son point de fusion, on provoque une fragmentation conduisant à un mélange de deux composés qui distillent.

La chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse, permet de définir ces deux composés volatils :

— L'un est un hydrocarbure éthylénique de masse moléculaire 140 et de formule brute $C_{10}H_{20}$.

— L'autre est un aldéhyde *15*, de masse moléculaire 128 et de formule brute $C_8H_{16}O$; il décolore le réactif de Schiff et donne une dinitrophénylhydrazone *16*.

Enfin, le résidu de la distillation renferme du propionate de potassium.

Sous l'effet de la chaleur les β-hydroxyacides et β-hydroxyesters perdent généralement une molécule d'eau pour conduire à des acides éthyléniques. Cependant, la formation d'aldéhydes, lors de la décomposition thermique d'acides ou d'esters α-ramifiés β-hydroxylés, n'est pas un phénomène surprenant. La présence des ramifications en α de la fonction acide joue un rôle essentiel pour l'induction de cette réaction. Ainsi, dès 1880, SCHNAPP (**34**) signalait que, par distillation, l'acide diéthyl-2,2 hydroxy-3 butyrique se dédoublait en acétaldéhyde et acide éthyl-2 butyrique :

$$CH_3-CHOH-C(C_2H_5)_2-COOH \longrightarrow CH_3-CHO + C_2H_5-CH(C_2H_5)-COOH$$

et REFORMATSKY (**35**) observait une fragmentation semblable de l'acide diméthyl-2,2 hydroxy-3 butyrique.

Plus tard, WALLACH (**36**) décrivait une décomposition analogue pour un acide ne portant qu'un seul substituant en α : la pyrolyse de l'acide α-menthol propionique fournit de la menthone et de l'acide propionique.

$$\text{[acide }\alpha\text{-menthol propionique: cycle-C(OH)-CH(CH}_3\text{)-COOH]} \longrightarrow \text{[menthone]} + CH_3-CH_2-COOH$$

Ce type de réaction a été utilisé par ASSELINEAU et LEDERER (**37**) dans le cas des acides mycoliques, acides β-hydroxylés portant en α une longue chaîne aliphatique. Par analyse des fragments de la pyrolyse, ces auteurs ont pu déduire la structure des acides mycoliques

$$C_{51}H_{99}-CHOH-CH(C_{24}H_{49})-COOH \longrightarrow C_{51}H_{99}-CHO + C_{24}H_{49}-CH_2-COOH$$

Dans d'autres cas, on a observé que la distillation sèche des acides β-hydroxylés donne naissance à un hydrocarbure éthylénique à côté d'eau et d'anhydride carbonique. WALLACH (**38**) admet que cette réaction passe par l'intermédiaire de l'acide α-éthylénique, tandis que FISCHER (**39**) penche pour la formation d'une β-lactone instable, immédiatement décomposée en CO_2 et carbure éthylénique :

$$R-CHOH-CH_2-COOH \longrightarrow R-\underset{|____O-CO____|}{CH-CH_2} + H_2O \longrightarrow R-CH=CH_2 + CO_2$$

Schéma réactionnel

En plus des produits déjà mentionnés, nous avons observé dans une expérience la formation, en très faible quantité, d'une β-lactone que nous avons caractérisée par sa fréquence d'absorption en IR ($\nu_{C=O}$ = 1825 cm-[1]). Comme nous le verrons ultérieurement, nous avons synthétisé cette β-lactone ; par chauffage elle subit, à partir de 160°C, une décarboxylation pour conduire à l'hydrocarbure éthylénique $C_{10}H_{20}$.

Nous proposons pour la fragmentation pyrolytique du sel de l'acide bourgéanique le schéma réactionnel suivant :

Il montre la formation de l'aldéhyde *15*, par coupure en β de la fonction ester, selon un mécanisme électronique concerté du même type que celui qui régit certaines réactions de fragmentation, comme la décarboxylation des β-cétoacides. L'autre fragment se décompose alors en propionate de potassium et β-lactone. Sous l'effet de la température, celle-ci perd une molécule de CO_2 pour conduire à l'hydrocarbure éthylénique $C_{10}H_{20}$.

Signalons, par ailleurs, que si l'on pyrolyse le sel de potassium de l'acide hémibourgéanique, on obtient globalement la formation des mêmes fragments. Il faut supposer alors deux réactions parallèles : l'une conduisant à la formation d'aldéhyde et de propionate de potassium, l'autre d'hydrocarbure éthylénique.

Le fait d'opérer sur des sels, au lieu des acides libres ou de leurs esters, permet d'obtenir immédiatement des réactions plus complètes les sels étant peu volatils. En effet, si l'on pyrolyse l'acide bourgéanique libre à une température de 200-250°C, on obtient peu d'aldéhyde et essentiellement un mélange d'acides hémibourgéanique et α-éthylénique correspondant.

Structure de la dinitro-2,4 phénylhydrazone 16

L'aldéhyde *15* produit par la pyrolyse a été isolé sous forme de sa dinitro-2,4 phénylhydrazone. C'est un solide jaune, fondant à 96-96,5°C, et présentant, en solution dans le chloroforme, un pouvoir rotatoire : $\left[\alpha\right]_D^{20} = -16{,}1^{\circ}$ (c = 0,70).

Les résultats précédents conduisent à attribuer comme formule générale pour cette substance :

$$R_2(R_3)CH_2{-}CH_1{=}DNPH \qquad R_2 + R_3 = C_6H_{14}$$

On aurait pu s'attendre à observer en RMN pour le proton H-1 un doublet, puisque, d'après cette formule, il n'est couplé qu'avec un seul proton H-2. Or, on observe quatre raies. Ceci s'explique par un dédoublement dû à la présence de diastéréoisomères. En effet, le carbone asymétrique C_α a été racémisé lors de la pyrolyse puisqu'il est en α d'un carbonyle, et nous admettrons cette racémisation comme totale. Cette molécule conservant un pouvoir rotatoire a, dans ces conditions, au moins un autre carbone asymétrique.

Cette hypothèse permet, en outre, d'expliquer le point de fusion relativement bas de cette DNPH : il est, en effet, inférieur à la valeur moyenne de ceux de DNPH d'aldéhydes de même condensation en carbone, et ceci peut être attribué à la présence de diastéréoisomères.

Analyse du spectre de masse de la DNPH 16

Les travaux de Djerassi (**40**) ont montré que, lors de leur analyse en spectrométrie de masse, les dinitrophénylhydrazones d'aldéhydes supérieurs présentent une rupture de la liaison en β de la chaîne alkyle, accompagnée du réarrangement d'un atome d'hydrogène pris sur le carbone en γ, analogue au réarrangement de McLafferty des cétones.

Les substituants méthyles du carbone en α vont augmenter la masse de l'ion formé d'autant, puisqu'ils vont rester fixés sur ce carbone.

CH_3 α β H R N—NH—C_6H_3—NO_2 (NO_2) $\xrightarrow{-R-CH=CH_2}$ CH_3—CH=CH—NH—NH—C_6H_3—NO_2 (NO_2)

m/e = 238

On observe, dans le spectre de la dinitrophénylhydrazone, un ion moléculaire à m/e = 308 ($C_{14}H_{20}N_4O_4$) 57 %. La fragmentation, avec réarrangement de McLafferty, conduit à l'ion m/e = 238 (45 %; m* = 184). Ceci implique que l'un des substituants R_2 ou R_3 = CH_3. Posons $R_2 = CH_3$, il en résulte que $R_3 = C_5H_{11}$.

Par ailleurs, on observe la perte de 15 et 29 unités de masse à partir de l'ion moléculaire pour conduire aux ions m/e = 293 ($M^+ - CH_3$) 2 % et m/e = 279 ($M^+ - C_2H_5$) 10 % respectivement. Ce dernier point montre que le groupe R_3 renferme un radical éthyle.

Ces résultats conduisent à écrire la substance étudiée :

$$CH_3{-}CH_2{-}[C_3H_6]{-}CH(CH_3){-}CH{=}DNPH$$

Cinq formules sont alors possibles pour le fragment entre crochets :

a $[CH_2{-}CH_2{-}CH_2]$

b $[CH(CH_3){-}CH_2]$

c $[CH_2{-}CH(CH_3)]$

d $[C(CH_3)(CH_3)]$

e $[CH(CH_2{-}CH_3)]$

Nous avons vu précédemment que la molécule renferme au moins deux carbones asymétriques, ce qui élimine les formules a, d et e qui ne font pas apparaître de carbone asymétrique supplémentaire, seules restent possibles b et c.

Un pic d'intensité faible à m/e = 251 ($M^+ - 57$) 5 % correspond à la perte d'une unité C_4H_9, ce qui est en faveur de la formule b. Comme l'on n'observe pas la perte d'une unité C_3H_7 attendue avec la formule c, nous admettrons la formule b comme représentative. La structure de cette DNPH est donc :

$$CH_3{-}CH_2{-}CH(CH_3){-}CH_2{-}CH(CH_3){-}CH{=}DNPH$$

16

Commentaires annexes sur le spectre de masse de la DNPH *16*

Le spectre de masse de la DNPH présente d'autres fragmentations dont l'étude, même si elle n'apporte pas d'éléments utiles à l'élucidation de la structure, est intéressante en soi.

Différents auteurs (**40**, **41**, **42**) ont signalé que les DNPH d'aldéhydes aromatiques perdaient 35 unités de masse ($H_2O + OH\cdot$) à partir de l'ion moléculaire, et non celles d'aldéhydes aliphatiques. Effectivement, dans notre cas, on n'observe pas une telle fragmentation.

Une fragmentation bien établie est la perte d'une molécule d'eau par l'ion formé par le réarrangement de McLafferty, aussi bien pour les DNPH de cétones que pour celles

d'aldéhydes. Elle met en jeu les atomes d'oxygène du groupe *o*-nitro, puisqu'on ne l'observe pas avec les *p*-nitrophénylhydrazones. Nous l'avons constatée ($a \rightarrow b$) dans le cas de l'aldéhyde diméthyl-2,4 hexanoïque et dans celui de l'aldéhyde n-octanoïque étudié à titre de comparaison.

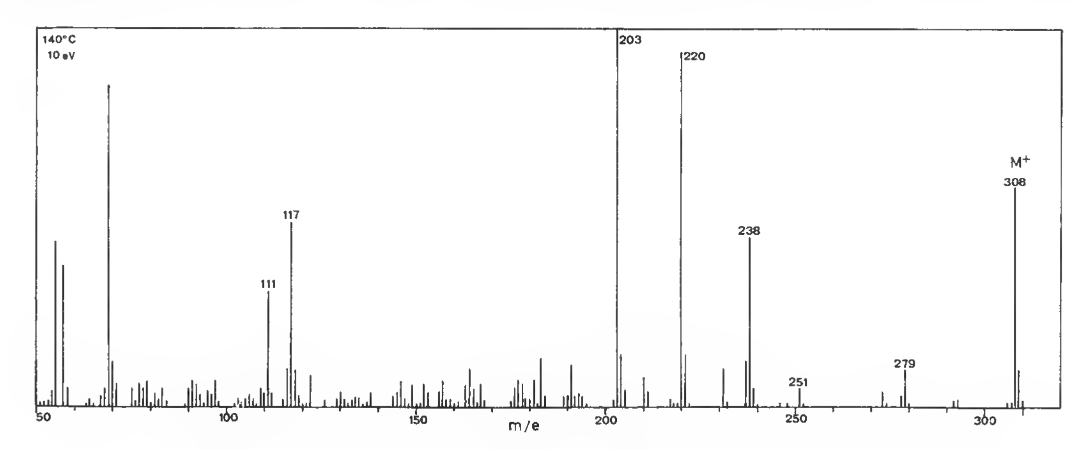


Fig. 5. — Spectre de masse de la dinitro-2, 4 phénylhydrazone du diméthyl-2, 4 hexanal *16*.

Les DNPH d'aldéhydes α-ramifiés se distinguent des aldéhydes linéaires puisque, dans ce cas, l'ion *b* perd un radical OH pour former l'ion *c* de façon analogue aux DNPH des cétones (**43**, **44**). Nous avons montré par l'étude des transitions et la haute résolution que l'ion *c* ($C_9H_7N_4O_2$, Calc. 203,0569 ; Tr. 203,0568) provient de l'ion *b* par perte du radical OH. Cette fragmentation n'est pas observée dans le cas de la DNPH du n-octanal.

O_2N — NH–NH–CH=CH–CH_3 — NO_2 ; a: m/e = 238 (45%)

$-H_2O$ m* = 203,3

O_2N — N=N–CH=CH–CH_3 — N=O ; b: m/e = 220 (94%)

$-OH^{\cdot}$ m* = 187,3

c: $C_9H_7N_4O_2^+$ m/e = 203 (100%)

b': m/e = 220

$-NO$, $-HCN$

d: m/e = 163 (6%)

$-NO_2^{\cdot}$

$C_8H_7N^{+\cdot}$ e: m/e = 117 (49%)

Un autre mode de fragmentation pour l'ion *b*, sans doute par l'intermédiaire de l'ion *b'*, est l'élimination de groupes NO et HCN pour conduire à *d*, lequel par perte d'un radi-

cal NO_2^- donne *e* ($C_8H_7N^+$, Calc. 117,0578 ; Tr. 117,0585). Cette fragmentation apparaît également avec la DNPH du n-octanal et avait été signalée par DJERASSI pour des DNPH d'aldéhydes linéaires.

En résumé, la perte de 35 unités de masse par l'ion issu du réarrangement de McLafferty, classique avec les DNPH de cétones et insignifiante avec les DNPH d'aldéhydes aliphatiques linéaires, se retrouve dans le cas de l'aldéhyde aliphatique α-ramifié étudié.

L'ensemble des résultats décrits dans ce chapitre permet de proposer pour l'acide hémibourgéanique la structure suivante :

$$CH_3-CH_2-\underset{CH_3}{CH}-CH_2-\underset{CH_3}{CH}-\overset{OH}{CH}-\underset{CH_3}{CH}-COOH$$

et donc pour l'acide bourgéanique la structure plane :

$$CH_3-CH_2-\underset{CH_3}{CH}-CH_2-\underset{CH_3}{CH}-\overset{OH}{CH}-\underset{CH_3}{CH}-COO-\overset{CH_3-CH-COOH}{CH}-\underset{CH_3}{CH}-CH_2-\underset{CH_3}{CH}-CH_2-CH_3$$

L'acide bourgéanique est l'acide triméthyl-2, 4, 6 (hydroxy-3' triméthyl-2', 4', 6' octanoyloxy)-3 octanoïque.

La structure proposée a été confirmée par d'autres méthodes analytiques de façon indépendante : analyse du spectre de masse, du spectre du carbone 13 et du spectre de RMN du proton après expansion par un chélate de lanthanide.

E. — ANALYSE DES SPECTRES DE MASSE DE L'ACIDE BOURGÉANIQUE ET DE SES DÉRIVÉS

L'ion moléculaire de l'acide bourgéanique *1* apparaît à m/e = 387, comme cela a été vu précédemment, par suite de la capture d'un atome d'hydrogène. Le même phénomène se retrouve pour son ester méthylique *9* ($M^+ + 1 = 401$, 0,1 %) et pour l'acide déhydrobourgéanique *11* ($M^+ + 1 = 385$, 0,1 %).

$$CH_3-CH_2-\underset{\displaystyle CH_3}{CH}-CH_2-\underset{\displaystyle CH_3}{CH}\overset{a}{\vdots}\overset{\displaystyle R}{\overset{\|}{C}}\overset{b}{\vdots}\underset{\displaystyle CH_3}{CH}-COO\overset{c}{\vdots}\overset{\displaystyle CH_3-CH-COOR'}{\overset{|}{CH}}\overset{a'}{\vdots}\underset{\displaystyle CH_3}{CH}-CH_2-\underset{\displaystyle CH_3}{CH}-CH_2-CH_3$$

1 R = <H, OH R' = –H

9 R = <H, OH R' = $-CH_3$

11 R = =O R' = –H

On observe peu de fragments de masse élevée dans les trois cas ; on notera cependant la formation d'ions, par perte du groupe C_7H_{15} (→ M^+ — 99) correspondant à la rupture a ou a′, et d'ions par perte du groupe $C_8H_{16}O$ (→ M^+ — 128) provoqué par la rupture b avec transfert d'un atome d'hydrogène, dans le cas de *1* et de *9*. Dans le cas de *11*, la fragmentation b, classique sans transfert d'hydrogène, conduit à l'ion $C_8H_{15}O$ (m/e = 127, 95 %).

	$M^+ - C_7H_{15}$		$M^+ - C_8H_{16}O$	
1	m/e 287	6 %	m/e 258	3 %
9	m/e 301	14 %	m/e 272	9 %
11	m/e 287	1 %		

Le pic de base, dans le spectre de *1*, apparaît à m/e = 185 et correspond à la formule $C_{11}H_{21}O_2$ (Calc. 185,154 ; Tr. 185,154), de même que pour *11*. Cet ion est formé par la rupture c. La même fragmentation est observée dans le cas de *9* pour conduire cette fois à l'ion m/e = 199 ($C_{12}H_{23}O_2$, 100 %). Cet ion perd ultérieurement un CH_2 pour former l'ion m/e = 185 (31 %). Dans les trois cas l'ion m/e = 185 perd une molécule d'eau (— 18) pour aboutir à l'ion m/e = 167 (*1* : 53 % ; *9* : 37 % ; *11* : 90 %).

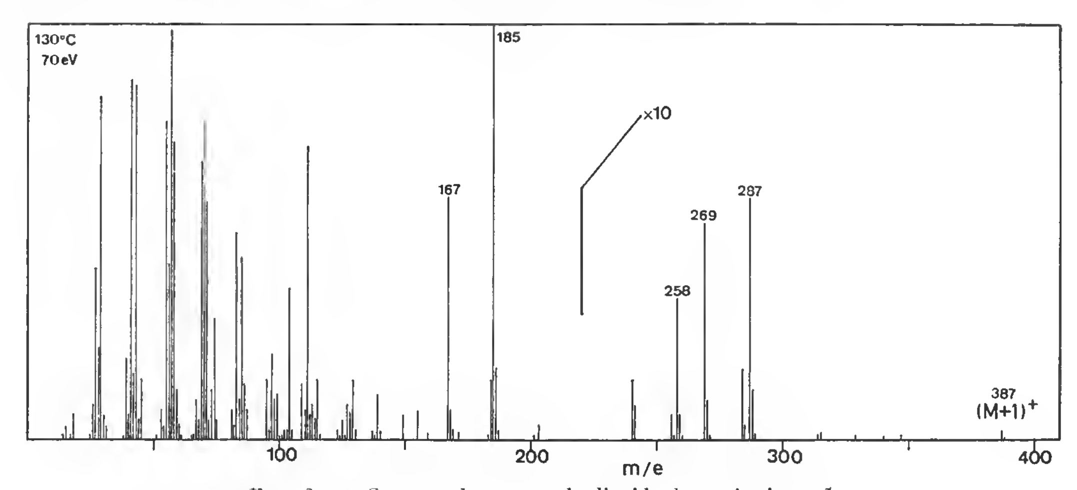


Fig. 6. — Spectre de masse de l'acide bourgéanique *1*.

F. — Étude du spectre de RMN du carbone 13

L'acide bourgéanique présente un spectre complexe pour lequel l'attribution rigoureuse des signaux aux 22 atomes de carbone de la molécule est délicate. Aussi discuterons-nous seulement le cas du spectre de l'acide hémibourgéanique *12*, qui ne possède que 11 atomes de carbone.

Le graphe suivant fait effectivement apparaître 11 signaux. La comparaison du spectre « off-resonance » et du spectre découplé permet de mettre en évidence quatre carbones primaires (CH_3), deux carbones secondaires (CH_2), quatre carbones tertiaires (CH), dont un $>$CHOH résonnant à $\delta = 75{,}48$ ppm, et un carbonyle d'acide à 181,3 ppm.

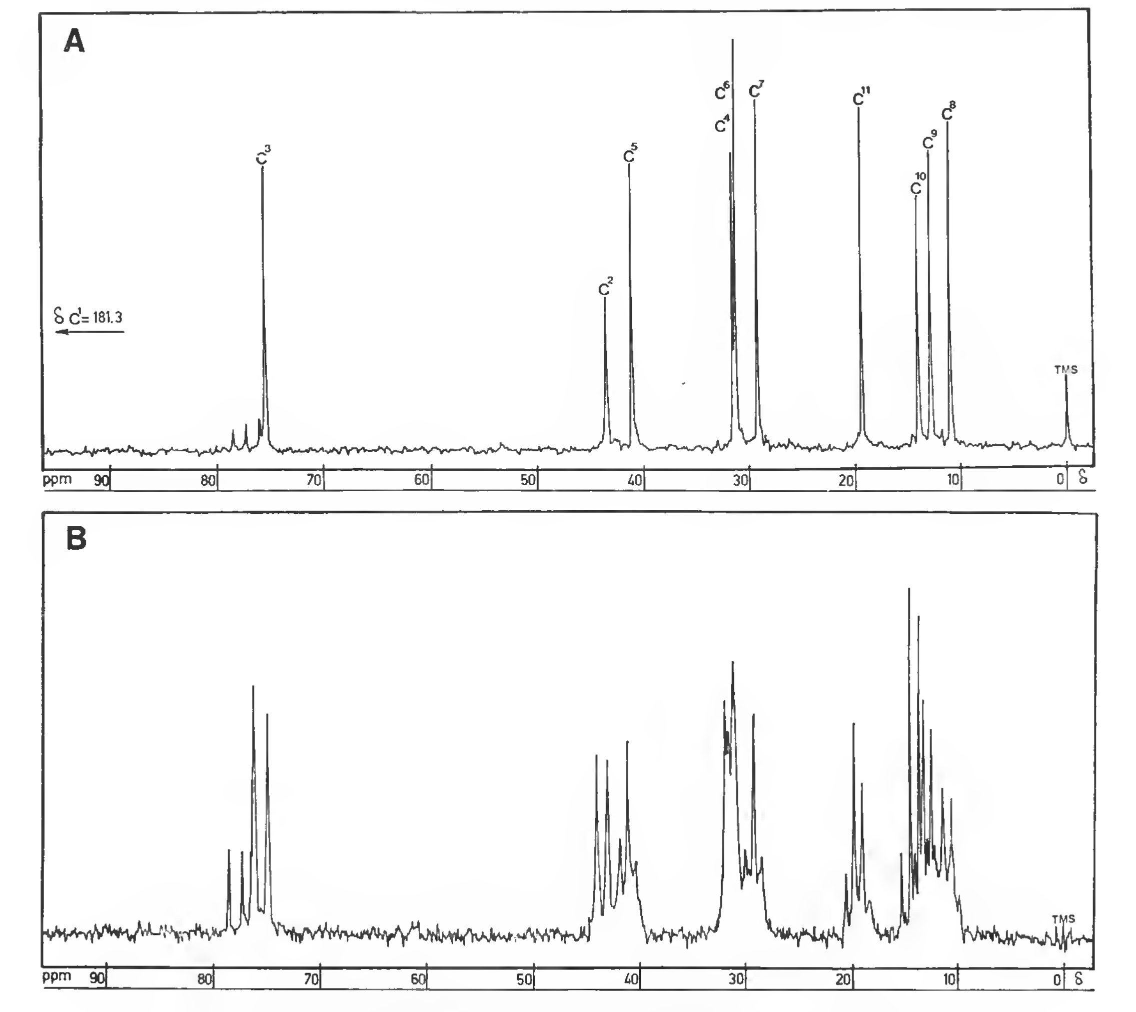


Fig. 7. — Spectre de RMN (C-13) de l'acide hémibourgéanique ($CDCl_3$).
A : spectre totalement découplé. B : spectre « off-resonance ».

Il était tentant d'examiner si la règle de GRANT et PAUL (**45**), modifiée par LINDEMAN et ADAMS (**46**), qui permet de calculer à priori le déplacement chimique dans le cas des alcanes, pouvait encore conduire à des données précises dans notre cas.

Le déplacement chimique du k ième carbone est donné par la relation :

$$\Delta c(k) = B_s + \sum_{M=2}^{4} D_M A_{sM} + \gamma_s N_{k3} + \Delta_s N_{k4}$$

où B_s, A_{sM}, γ_s et Δs sont des constantes. N_{kP} est le nombre d'atomes de carbone à P liaisons du carbone k, D_M est le nombre d'atomes liés au carbone k.

Nous avons effectué les calculs en considérant la molécule comme un hydrocarbure saturé :

$\overset{8}{C}H_3-\overset{7}{C}H_2-\overset{6}{C}H(\overset{11}{C}H_3)-\overset{5}{C}H_2-\overset{4}{C}H(\overset{10}{C}H_3)-\overset{3}{C}H(CH_3)-\overset{2}{C}H(\overset{9}{C}H_3)-H$; H ⟶ COOH ; CH_3 ⟶ OH

puis avons tenu compte des incréments dus au remplacement d'un groupe méthyle par un hydroxyle d'une part, et au remplacement d'un proton par un carboxyle d'autre part. Ces paramètres ont été déterminés par ROBERTS, JACKMAN et HAGEN (**47**, **48**, **49**).

Le tableau suivant montre qu'on obtient une excellente corrélation pour tous les carbones, sauf pour le carbone — 2. Ceci laisse supposer que l'influence du carboxyle a été surestimée.

Néanmoins ces résultats sont suffisamment concordants pour confirmer la structure avancée. De plus, les spectres mettent bien en évidence la présence d'un seul isomère.

δ calc. ppm	δ mes. ppm	Δ δ	Attribution	
10,87	11,08	— 0,21	C^8	CH_3
12,36	12,92	— 0,56	C^9	CH_3
15,43	14,09	+ 1,34	C^{10}	CH_3
19,63	19,43	+ 0,20	C^{11}	CH_3
29,85	29,26	+ 0,59	C^7	CH_2
32,52	31,30	+ 1,22	C^6	CH
33,19	31,54	+ 1,65	C^4	CH
39,22	41,02	— 1,80	C^5	CH_2
49,41	43,46	+ 5,95	C^2	CH
78,02	75,48	+ 2,54	C^3	CH

G. — ÉTUDE DU SPECTRE DE RMN DU PROTON EN UTILISANT LES CHÉLATES DE TERRES RARES

L'analyse approfondie du spectre de RMN de l'acide hémibourgéanique est sérieusement limitée par le fait, qu'en dehors des protons situés à proximité immédiate des groupes

fonctionnels, les autres résonnent dans une même zone de fréquence. Les déplacements induits par les chélates de terres rares, comme Eu(dpm)$_3$, vont permettre en accentuant l'inéquivalence des protons de rendre ce spectre analysable.

Les fonctions acides décomposant le chélate on utilise l'ester méthylique *14*. Cette molécule possède deux fonctions, alcool et ester, ayant des électrons disponibles (bases de Lewis). On peut donc présupposer une compétition d'association entre ces sites et Eu (dpm)$_3$. De plus, ces sites étant proches il est possible d'envisager une complexation bidentée. Cependant l'association sera beaucoup plus forte, du moins aux faibles concentrations, avec la fonction alcool qu'avec la fonction ester, puisqu'elle dépend de la basicité des doublets disponibles des hétéroatomes.

Eu(dpm)$_3$ induit de façon prédominante des interactions de pseudo-contacts et, comme la molécule ne renferme que des liaisons σ, les interactions seront exclusivement de cette nature. Dans ces conditions, les déplacements ne dépenderont que de la distance du groupe considéré au site d'association, au moins en première approximation.

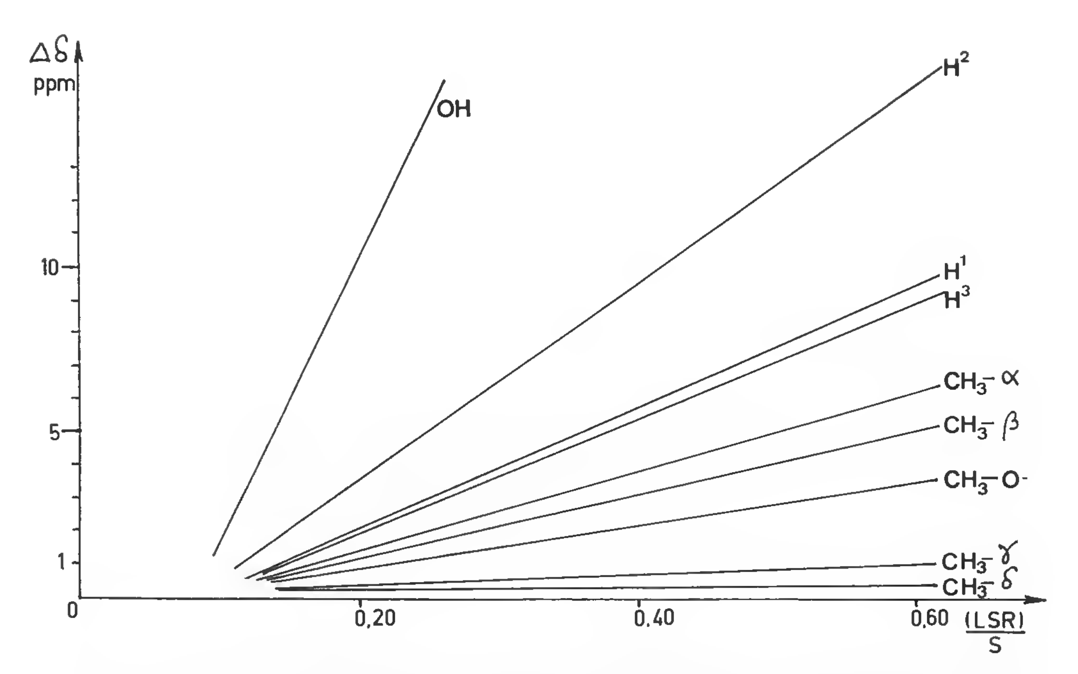


Fig. 8. — Variation du déplacement chimique des protons de l'hémibourgéanate de méthyle, en fonction du rapport de la concentration en chélate à celle du substrat.

En traitant par des quantités croissantes de tridipivalométhanate d'europium l'ester méthylique de l'acide hémibourgéanique, on observe un déplacement significatif des protons. Le site d'association est essentiellement l'hydroxyle resté libre. Le diagramme (fig. 8) représente le déplacement induit en fonction de la concentration molaire du chélate pour une quantité déterminée de substrat. On opère avec un rapport (LSR)/S variant de 0,2 à 0,6, la corrélation est alors linéaire.

On observe que le proton H-2, le plus proche du site d'association, se déplace le plus rapidement, que les protons H-1 et H-3, situés à la même distance de ce site, ont des vitesses de déplacement sensiblement équivalentes, de même que les méthyles α et β. Le fait que H-1 se déplace légèrement plus vite que H-3 (le même phénomène est observé pour CH_3-α par rapport à CH_3-β) peut s'expliquer en admettant une faible participation du carbonyle du carboxylate dans l'association.

Enfin, les CH_3-γ et δ éloignés sont déplacés lentement. Notons que les méthyles α, β et γ apparaissent sous forme de doublets, ce qui entraîne qu'ils sont portés par un carbone tertiaire, et le méthyle δ sous forme de triplet : il est porté par un carbone secondaire.

Autrement dit, ces résultats montrent que, de part et d'autre du groupe -CHOH-, il y a un groupe $>$CH-CH_3 dont l'un est en α d'un carboxyle. Il reste à placer dans la molécule les groupes CH_3-CH_2-, CH_3-CH$<$ et -CH_2- mis en évidence. Il n'y a que deux possibilités :

```
                          OH
                          |
CH3-CH2-CH2-CH-CH-CH---CH-COO-CH3
δ           |   |          |
           CH3 CH3        CH3
            γ   β          α

                 a
```

```
                        OH
                        |
CH3-CH2-CH-CH2-CH-CH-CH-COO-CH3
        |      |     |
       CH3    CH3   CH3

                 b
```

Le déplacement du méthyle γ étant voisin de celui du méthyle δ et très différent de celui du méthyle β, on en conclut qu'il est plus éloigné du centre de chélation que ne l'indique la formule (a). C'est donc la formule (b) qui est correcte. On retrouve bien la structure qui a été attribuée précédemment.

L'acide bourgéanique possède huit atomes de carbone asymétriques : il est donc un des $2^8 = 256$ stéréoisomères qu'inclut sa structure plane.

Nous avons vu que, par hydrolyse alcaline, il ne conduit qu'à un seul acide hémibourgéanique *12*. L'hydrolyse alcaline des esters se faisant avec conservation de la configuration de l'atome de carbone portant la fonction alcool, on en conclut que les deux entités *12* qui constituent l'acide bourgéanique ont la même configuration absolue.

Pour déterminer la configuration de l'acide bourgéanique, il suffit donc de déterminer celle de l'acide hémibourgéanique.

Dans ce but, nous allons effectuer la synthèse de cet acide et comparer les différents stéréoisomères ainsi obtenus à l'isomère naturel. Par ailleurs, nous examinerons les propriétés chimiques des acides bourgéanique et hémibourgéanique pour en tirer des arguments stéréochimiques.

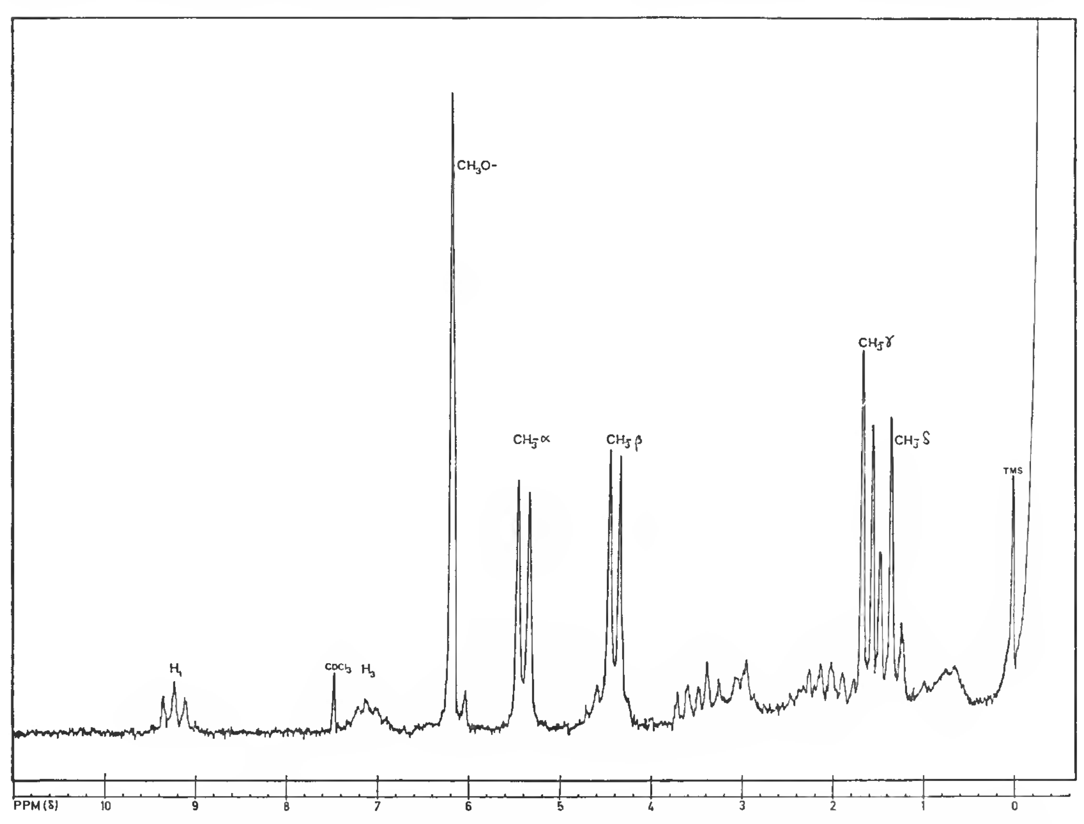


FIG. 9. — Spectre de RMN de l'hémibourgéanate de méthyle après expansion par $Eu(dpm)_3$.

II. SYNTHÈSE, PROPRIÉTÉS CHIMIQUES ET CONFIGURATION DE L'ACIDE BOURGÉANIQUE

A. — Synthèse

1. Synthèse de l'acide hydroxy-3 triméthyl-2, 4, 6 octanoïque

La synthèse de cet acide va permettre, d'une part de confirmer la structure plane de l'acide hémibourgéanique, et d'apporter d'autre part, par comparaison, des éléments utiles à la définition de sa structure spatiale.

Plusieurs méthodes pouvaient être envisagées pour réaliser cette synthèse. La voie choisie, inverse de celle utilisée lors de la fragmentation thermique de l'acide bourgéanique, consiste à préparer intermédiairement le diméthyl-2,4 hexanal. Celui-ci peut être aisément obtenu, ainsi que l'a montré H. C. Brown (**50**), à l'aide des alcoylboranes.

Trois molécules de butène-2, en solution dans le tétrahydrofuranne anhydre réagissent spontanément sur une molécule de borane pour donner une molécule de tributyl-2 borane.

$$3\ CH_3-CH=CH-CH_3 + BH_3 \longrightarrow (CH_3-CH_2-CH(CH_3))_3B$$

Cet organo-borane, par une addition -1,4 remarquablement rapide sur la méthyl-2 acroléine, conduit à un borinate d'énol intermédiaire, dont l'hydrolyse fournit le diméthyl-2,4 hexanal *17*. Celui-ci est isolé par distillation sous pression réduite.

$$(CH_3-CH_2-CH(CH_3))_3B + CH_2=C(CH_3)-CHO \longrightarrow CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-C(CH_3)=CH-OB(C_4H_9)_2$$

$$\xrightarrow{H_2O} \underset{\underline{17}}{CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH(CH_3)-CHO} + (C_4H_9)_2BOH$$

Cette réaction n'étant pas stéréospécifique, on obtient le mélange des quatre isomères optiques : *a*, *b*, *c* et *d* formant deux couples de diastéréoisomères : (*a* et *b*) et (*c* et *d*) énantiomorphes. Ils sont représentés dans le schéma suivant avec la convention de Fischer.

a b c d

Cet aldéhyde a été caractérisé par sa dinitro-2,4 phénylhydrazone *18*. Celle-ci présente les mêmes caractéristiques physico-chimiques, au pouvoir rotatoire près, que la DNPH *16* de l'aldéhyde $C_8H_{16}O$ obtenu lors de la pyrolyse du sel de potassium de l'acide bourgéanique. (Même point de fusion, point de fusion du mélange non abaissé, spectres IR et de RMN superposables.) En particulier, le spectre de RMN montre la même multiplicité des signaux dus au -HC = N-N.

Cette identité peut paraître, à priori, surprenante puisque la synthèse conduit à quatre isomères optiques, mais elle s'explique aisément. En effet, nous avons vu précédemment que l'aldéhyde obtenu à partir du produit naturel a été épimérisé au niveau du carbone -2, et qu'alors, selon que le carbone -4 est D ou L, nous avons obtenu le mélange de diastéréoisomères (a + b) ou (c + d). Toutes les propriétés, à l'exclusion du pouvoir rotatoire, sont identiques pour ces deux couples qui sont énantiomorphes et donc pour leur mélange (a + b + c + d). Ceci explique logiquement les résultats obtenus.

Condensé, selon la méthode de Reformatsky, avec le bromo-2 propionate d'éthyle, le diméthyl-2,4 hexanal *17* donne l'hydroxy-3 triméthyl-2,4,6 octanoate d'éthyle : *19*.

17 + Br–CH(CH3)–COOEt —Zn→ 19

L'acide hydroxy-3 triméthyl-2,4,6 octanoïque *20* est obtenu par l'hydrolyse alcaline de cet ester.

19 → 20

Sa structure a été vérifiée par spectrométrie de masse, infrarouge et de résonance magnétique nucléaire.

Cette molécule renfermant quatre carbones asymétriques, on doit donc attendre $2^4 = 16$ isomères optiques, dont 8 diastéréoisomères. Ceux-ci sont difficiles à différencier.

Il est cependant possible d'étudier la configuration relative des carbones asymétriques porteurs de groupes fonctionnels : c'est le cas des carbones -2 et -3. Si l'on ne tient compte que d'eux, on peut écrire les formes *érythro* E et *thréo* T, indiquées par le schéma suivant et définies par la convention de Fischer :

COOH
CH3 — H
HO — H
R
Erythro

Ea Eb Ec

COOH
CH3 — H
H — OH
R
Threo

Ta Tb Tc

Formes décalées R= $-CH(CH_3)-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$

Différents conformères sont possibles, mais ceux ayant le maximum de probabilité d'existence sont E_a, T_a et T_b qui permettent une liaison hydrogène intramoléculaire. E_b le permettrait aussi, mais les interactions stériques y sont plus importantes que dans le cas de E_a.

E T

Par ailleurs, l'examen des formes éclipsées montre que la liaison hydrogène intramoléculaire sera plus facile à réaliser dans le cas de l'isomère *érythro* que dans celui du *thréo*, puisqu'il présente un encombrement stérique moindre.

Ces deux diastéréoisomères, produits en mélange par la synthèse, peuvent être séparés par chromatographie sur couche mince sous la forme de leurs esters méthyliques *21*. En effet, Polgar et coll. (**51**) ont montré que les esters méthylique et éthylique des acides *érythro*-2,3 et *thréo*-2,3 hydroxy-3 diméthyl-2,4 docosanoïques se différencient par chromatographie sur film de gel de silice, et que le dérivé *thréo* est plus fortement retenu. Cet argument s'appuie sur le fait que le groupe hydroxyle, dans le composé *thréo*, est engagé dans une moindre mesure dans une liaison hydrogène intramoléculaire et que, dans ces condi-

tions, il va donner des liaisons plus solides avec la phase stationnaire. Il faut noter cependant que ces différences de polarité sont faibles.

Analysé par chromatographie sur plaque de gel de silice, avec comme éluant le mélange hexane-acétone (93/7) et en opérant trois passages, l'ester synthétique *21* présente deux taches : l'une A (Rf = 0,49) est attribuée à l'isomère *érythro* E, l'autre B (Rf = 0,41) à l'isomère *thréo* T.

La chromatographie comparative de l'ester méthylique de l'acide hémibourgéanique, d'origine naturelle *14*, donne dans les mêmes conditions une tache (Rf = 0,49) identique à A. Il faut donc attribuer à cet ester une structure *érythro*.

Jacques et coll. (**52**), d'une part, et Polgar, d'autre part, ont montré que, dans le cas d'acides α-ramifiés β-hydroxylés, les protons H_α et H_β résonnent à champ plus fort pour l'isomère *érythro* que pour l'isomère *thréo*. Dans notre cas, cette différence ne paraît pas suffisamment nette pour être un argument.

Proportion des isomères érythro et thréo

Le pourcentage des formes E et T du hydroxy-3 triméthyl-2,4,6 octanoate de méthyle synthétique *21* a pu être déterminé grâce à la RMN. Le spectre (dans CCl_4.) confond en un singulet (3,66 ppm) les groupes OCH_3 des différents isomères. L'addition de $Eu(fod)_3$ permet de les séparer car ils ne s'associent pas tous de la même façon ; en ajoutant une petite quantité d'hydroxy-3 triméthyl-2,4,6 octanoate de méthyle naturel, on identifie les isomères *érythro*. On détermine ainsi, par la mesure de l'intensité des pics OCH_3, que le mélange renferme 60 % d'isomères *érythro*-2,3 et 40 % d'isomères *thréo*.

2. Synthèse de l'acide bourgéanique

La synthèse de l'acide bourgéanique lui-même peut être réalisée en traitant l'acide hydroxy-3 triméthyl-2,4,6 octanoïque par le dicyclohexyl-carbodiimide. En opérant sur l'acide d'origine naturelle *12*, pour éviter la présence d'un nombre considérable d'isomères, on obtient effectivement l'acide bourgéanique, mais avec de faibles rendements (14 %) : il se forme, dans ces conditions, de nombreux produits secondaires par déshydratation intramoléculaire dont la β-lactone et l'acide α-éthylénique correspondants à l'acide de départ.

B. — Propriétés chimiques de l'acide bourgéanique et de ses dérivés

L'acide bourgéanique *1*, de même que l'acide hémibourgéanique *12*, possédant une fonction acide et une fonction alcool, vont donner des réactions de déshydratation qu'on peut logiquement attendre de ce type de composés : formation de lactones et formation d'acides éthyléniques.

Une autre approche, pour définir la configuration relative des carbones -2 et -3, consiste à transformer l'acide hémibourgéanique *12* en β-lactone correspondante et d'étudier le couplage $J_{H\alpha\ H\beta}$.

1. Formation de β-lactone

De nombreuses méthodes existent pour cycliser les acides α-ramifiés β-hydroxylés en β-lactones. La plupart des agents de cyclisation sont peu satisfaisants, car ils donnent des rendements modestes, tels l'anhydride acétique, le chlorure de thionyle dans la pyridine, l'isopropyl-carbodiimide ou le pentoxyde de phosphore. Cependant, SULTAMBAWA a décrit (**53**) une voie d'obtention des β-lactones utilisant le chlorure de méthane sulfonyle en présence de carbonate de sodium, à froid, particulièrement commode et donnant des rendements élevés. (Le même résultat peut être obtenu avec le chlorure de tosyle.)

$C_7H_{15}-CH(OH)-CH(COOH)-CH_3$ (12) $\xrightarrow[Na_2CO_3]{CH_3-SO_2\,Cl}$ $C_7H_{15}-CH-CH-CH_3$ (O—CO) (22)

De plus on sait (**54, 55**) que cette réaction s'effectue avec conservation de la configuration de l'atome de carbone portant la fonction hydroxyle, le mécanisme impliquant vraisemblablement la formation d'un anhydride mixte intermédiaire.

Traité dans ces conditions, l'acide hémibourgéanique *12* conduit à la lactone *22*. Sa structure a été prouvée grâce à son spectre IR qui montre une bande intense à 1825 cm^{-1}, caractéristique des carbonyles du cycle tendu des β-lactones, et l'absence d'hydroxyle.

En spectrométrie de masse, on observe le pic moléculaire attendu à m/e = 184 ($C_{11}H_{20}O_2$). Une des fragmentations caractéristiques conduit par perte de CO_2 à l'ion m/e = 140.

$C_7H_{15}-CH-CH-CH_3$ (O—CO^{+}) m/e=184 $\longrightarrow$ $[C_7H_{15}-CH{=}CH-CH_3]^{+}$ + CO_2 m/e=140

Le spectre de RMN est en accord avec cette structure, en particulier : δ ppm = 3,86 (d de d, 1H, H_β, $J_{H\alpha\,H\beta}$ = 4 Hz, $J_{H\beta\,H\gamma}$ = 8 Hz) et 3,25 (d de d, 1H, H_α, $J_{H\alpha\,H\beta}$ = 4 Hz, $J_{H\alpha\,CH_3}$ = 7,5 Hz).

La stéréochimie de la β-lactone obtenue dans cette réaction est déterminée par celle de l'acide de départ : selon que celui-ci est *érythro* ou *thréo*, elle sera *trans* ou *cis*.

Erythro (R, H, COOH, H, OH, CH3) ⟶ Trans (H, R, CO, O, H, CH3)

Threo (H, H, COOH, R, OH, CH3) ⟶ Cis (H, H, CO, O, R, CH3)

L'analyse du spectre de RMN fait apparaître une constante de couplage $J_{H\alpha\ H\beta}$ = 4 Hz. Or, ABRAHAM (**56**) a effectué une étude approfondie sur les constantes de couplage J *cis* et J *trans* pour la propiolactone et déterminé qu'on devait attendre les valeurs :

J *cis* = 6,93 Hz et J *trans* = 4,61 Hz.

Le résultat obtenu, dans notre cas, implique une structure *trans* pour les deux protons du cycle, et il en découle une structure *érythro* pour l'acide β-alcool de départ. Ceci confirme la configuration qui lui a été attribuée précédemment.

La configuration relative des carbones -2 et -3 de l'acide hémibourgéanique est érythro.

2. Déshydratation de l'acide bourgéanique

Lors de tentatives d'acétylation de l'acide bourgéanique par l'anhydride acétique en présence de pyridine, en maintenant le milieu réactionnel à douce ébullition nous n'avons pas observé la formation de l'acétate attendu et nous avons obtenu un mélange de deux composés, l'un acide et l'autre neutre. La proportion relative de ces deux produits a été variable selon les expériences. En opérant à température ambiante et en prolongeant la durée de la réaction on augmente le pourcentage du composé neutre.

Structure du composé neutre

Le composé neutre *23* est un solide, cristallisant en aiguilles incolores et fondant à 77°C. Son spectre IR montre la disparition des fonctions alcool et acide (absence de bande OH) et l'apparition d'une bande intense à 1745 cm^{-1}, correspondant à l'absorption d'un carbonyle de lactone.

Le spectre de masse fait apparaître l'ion moléculaire à m/e = 368 ($C_{22}H_{40}O_5$), ce qui implique la perte d'une molécule d'eau par rapport à l'acide bourgéanique.

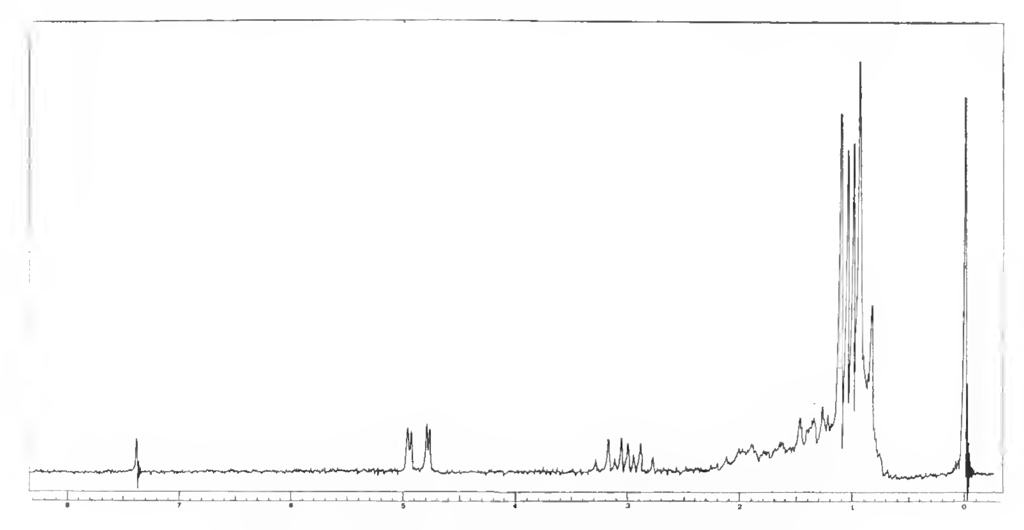


FIG. 10. — Spectre de RMN du lactide *23* ($CDCl_3$).

Le spectre de RMN (cf. fig. 10) très simplifié conduit à supposer que la molécule est symétrique.

Par ailleurs, l'hydrolyse alcaline de ce composé donne l'acide hydroxy-3 triméthyl-2,4, 6 octanoïque comme celle de l'acide bourgéanique.

Ces données ne laissent pas d'autre possibilité de structure pour la substance *23* que celle d'un lactide :

$CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH(CH_3)-$ [cycle : $CH(CH_3)-CO-O-CH-CH(CH_3)-CO-O-CH$] $-CH(CH_3)-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$

23

La formation de ce composé peut s'expliquer, soit par la simple estérification intramoléculaire de l'acide bourgéanique due à l'effet déshydratant de l'anhydride acétique, soit plutôt par une transestérification intramoléculaire de l'acide acétylbourgéanique, qui se serait formé intermédiairement. En effet, nous n'avons pas observé la formation de ce lactide en chauffant dans l'anhydride acétique ou dans la pyridine seuls.

Structure du composé acide 24

La fraction soluble dans le bicarbonate de sodium ne présente qu'une seule tache en chromatographie sur plaque de gel de silice (Rf = 0,69, éluant : acide acétique-toluène, 15/85). Ce produit se présente sous la forme d'un liquide huileux à la température ambiante. Cet acide peut être également obtenu en traitant l'acide hémibourgéanique par l'anhydride acétique et la pyridine.

Son spectre infrarouge montre qu'il est un acide α-éthylénique : le carboxyle absorbe à 1690 cm^{-1} et la double liaison à 1645 cm^{-1}.

$CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH(CH_3)-CH=C(CH_3)-COOH$

24

Par action du diazométhane, il est transformé en son ester méthylique.

Spectre de masse de l'acide éthylénique 24

On sait que l'ionisation des acides et esters insaturés en spectrométrie de masse (**57**) conduit à des migrations de la double liaison, empêchant ainsi la détermination de sa position originelle. L'analyse des spectres fournit cependant des indications de structure importantes.

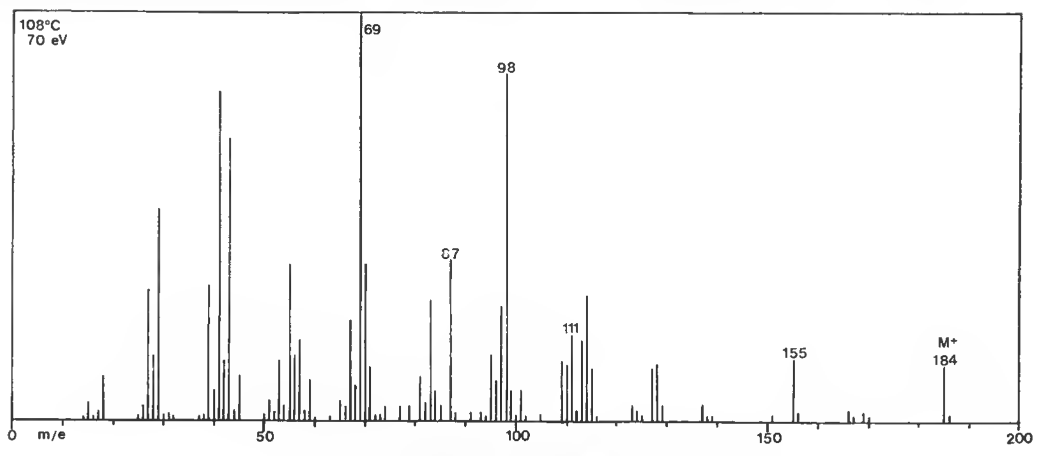


FIG. 11. — Spectre de masse de l'acide *24*.

L'ion moléculaire de l'acide éthylénique *24* apparaît à m/e = 184 (14 %) ($C_{11}HO_{20}O_2$) et celui de son ester méthylique à m/e = 198 (41 %) ($C_{12}H_{22}O_2$). Ils présentent une série de fragmentations analogues par perte de groupes : $-CH_3$ (M^+ -15), $-C_2H_5$ (M^+ -29), $-C_4H_9$ (M^+ -57) et $-C_5H_{11}$ (M^+ -71).

L'ion m/e = 101 (100 %) ($C_5H_9O_2$, Calc. 101,060 ; Tr. 101,060) dans le cas de l'ester est équivalent à $[-CH_2 - \underset{CH_3}{CH} - COOCH_3]^+$. Il a son homologue $[-CH_2 - \underset{CH_3}{CH} - COOH]^+$, m/e = 87 (39 %) dans le cas de l'acide. Ces fragments oxygénés sont caractéristiques de ce type de composés.

Un mécanisme a été avancé par ROHWEDDER (**58**) pour leur formation impliquant des réarrangements d'atomes d'hydrogène des carbones -4 et -6, mais GROFF (**59**) met en doute cette hypothèse.

L'ion m/e = 88, dans le cas de l'ester, est aussi caractéristique et correspond à

$$\left[\begin{array}{lll} CH = & C & -OCH_3 \\ CH_3 & & -OH \end{array}\right]^{+\cdot}$$

On observe enfin des ions hydrocarbonés intenses dans les deux cas à m/e = 111 (C_8H_{15}, Calc. 111,117 ; Tr. 111,118), m/e = 98 (C_7H_{14}, Calc. 98,109 ; Tr. 98,109) et m/e = 69 (C_5H_9). Ces ions qui peuvent avoir des origines diverses impliquent aussi des migrations d'atomes d'hydrogène.

Configuration

Cette réaction pouvait conduire, à priori, à la formation soit de l'isomère *cis*, soit de l'isomère *trans*, soit d'un mélange des deux. Le spectre de RMN (dans $CDCl_3$) indique la présence exclusive d'un seul de ces isomères (δ ppm = 6,72, 1H, d de q, J_d = 10 Hz, J_q = 1,5 Hz -CH = ; 1,85 3H d J_d = 1,5 Hz CH_3-C =).

MATTER et STERNHELL (**60**) ont publié une règle permettant de calculer à priori le déplacement chimique d'un proton éthylénique en fonction de son environnement. Le

calcul effectué, pour notre cas, conduit à un déplacement théorique pour le proton H_β de 6,20 ppm pour la structure A (*cis*) et 6,78 ppm pour la structure B (*trans*).

A: H(R)C=C(CH$_3$)(COOH) B: H(R)C=C(COOH)(CH$_3$)

La valeur mesurée (6,72 ppm) entraîne pour le produit obtenu la structure *trans* B. Cependant cette règle étant peu rigoureuse, nous avons vérifié le résultat par une autre méthode.

Davoust (**61**) a montré que le chlorure de praséodyme s'associe avec les acides éthyléniques pour induire des interactions qui sont essentiellement de pseudo-contact. Les déplacements paramagnétiques subis par les protons en RMN dépendent, dans ces conditions et pour un acide donné, de leur distance au site de complexation.

Appliquée à notre acide, cette méthode conduit au diagramme suivant, qui montre que c'est le proton H_β qui subit le déplacement le plus fort et qui est donc le plus proche du site de complexation. Ce résultat implique que c'est la structure B qui est correcte.

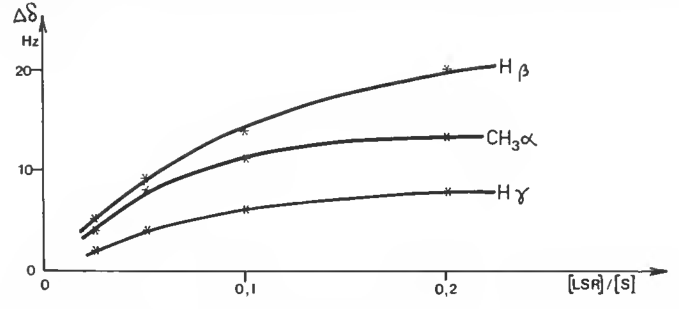


Fig. 12. — Variation du déplacement chimique des protons de l'acide *24*, induite par le chlorure de praséodyme.

Dans ces conditions, on peut expliquer la formation de cet acide éthylénique *24* par acétylation et transestérification de l'acide bourgéanique par l'anhydride acétique pour former un acétate intermédiaire avec conservation de la configuration du carbone -3. Sous l'effet de la chaleur, cet acétate subit une *cis*-élimination classique pour former l'acide *trans*-éthylénique.

$-CH_3COOH$ → R—CH=C(CH$_3$)—COOH <u>24</u>

Signalons que l'acide bourgéanique traité par l'acide formique à ébullition conduit

au formiate de l'acide hémibourgéanique *26*. Par pyrolyse, ce formiate fournit le même acide éthylénique *24*.

3. **Obtention de l'acide triméthyl-2,4,6 octanoïque**

La réduction par l'hydrogène en présence de catalyseur (Pd/C) de la double liaison de l'acide *24* permet d'obtenir l'acide triméthyl-2,4,6 octanoïque *26*. C'est un liquide huileux. Le spectre infrarouge indique la disparition de la double liaison et la présence d'un carbonyle d'acide aliphatique (ν_{CO} = 1712 cm-¹).

COOH —(H_2/Pd)→ COOH → $COOCH_3$

24 26 27

Son ester méthylique *27*, obtenu par action du diazométhane, est un liquide mobile qui présente, en solution dans le chloroforme, un pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{22}$ = -11,00° (c = 1,08). En infrarouge, la fonction carboxyméthyle absorbe à 1744 cm-¹. L'analyse du spectre de masse, dont les caractéristiques principales sont consignées dans le tableau suivant, confirme cette structure.

CH_3—CH_2—CH(CH_3)—CH_2—CH(CH_3)—CH_2—CH(CH_3)—$\overset{+\cdot}{C}OOCH_3$ m/e:200 (2%)

$\overset{+}{C}H_2$—CH(CH_3)—$COOCH_3$ m/e:101 (68%)

$\overset{+}{C}H$(CH_3)—CH_2—CH(CH_3)—$COOCH_3$ m/e:129 (10%)

[CH_3, H, C_5H_{11}—C, CH_2, CH, CH_3, $\overset{+\cdot}{O}$=C—OCH_3]

CH_3—CH_2—$\overset{+\cdot}{C}OOCH_3$ m/e:88 (100%)

Nous avons réalisé une synthèse totale de l'acide triméthyl-2,4,6 octanoïque en déshydratant l'acide hydroxy-3 triméthyl-2,4,6 octanoïque *18* et en hydrogénant catalytiquement l'acide α-éthylénique ainsi formé. L'acide obtenu est transformé en son ester méthylique *28* par le diazométhane.

L'acide triméthyl-2,4,6 octanoïque était connu, puisqu'il avait été isolé par Odham (**62**) des cires extraites de la glande uropygienne du cygne, où il se trouve sous forme d'ester d'alcool aliphatique à longue chaîne. Odham a décrit son ester méthylique *29*.

Les spectres IR de ces triméthyl-octanoates de méthyle des trois provenances (demi-synthétique à partir de l'acide bourgéanique *27*, synthétique *28* et naturelle *29*) sont semblables et les spectres de masse sont identiques. Cependant, cet ester renfermant trois carbones asymétriques, le nombre des stéréoisomères obtenus n'est pas le même dans les trois cas.

C. — Configuration

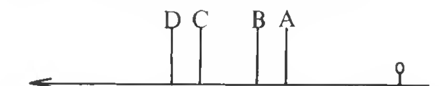
1. Configuration des triméthyl-2,4,6 octanoates de méthyl *27*, *28* et *29*

Le triméthyl-2,4,6 octanoate de méthyle d'origine synthétique *28* renferme huit isomères optiques formant quatre racémates A, B, C et D.

Ces quatre racémates peuvent être différenciés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire Golay, type R, comme l'a montré Odham (**62**).

$COOCH_3$	$COOCH_3$	$COOCH_3$	$COOCH_3$	$COOCH_3$	$COOCH_3$	$COOCH_3$	$COOCH_3$
$CH_3—C—H$	$H—C—CH_3$	$CH_3—C—H$	$H—C—CH_3$	$CH_3—C—H$	$H—C—CH_3$	$CH_3—C—H$	$H—C—CH_3$
CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2
$CH_3—C—H$	$H—C—CH_3$	$H—C—CH_3$	$CH_3—C—H$	$CH_3—C—H$	$H—C—CH_3$	$H—C—CH_3$	$CH_3—C—H$
CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2
$CH_3—C—H$	$H—C—CH_3$	$CH_3—C—H$	$H—C—CH_3$	$H—C—CH_3$	$CH_3—C—H$	$H—C—CH_3$	$CH_3—C—H$
CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2
CH_3	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3
I	II	I	II	I	II	I	II
A		B		C		D	

De plus, cet auteur a déterminé l'ordre de migration de chacun des racémates :



Notre triméthyl-2,4,6 octanoate de méthyle synthétique *28* donne trois pics (intensité relative : 1, 1, 2) lorsqu'il est chromatographié dans les conditions décrites par Odham, les racémates C et D n'étant pas séparés.

Le triméthyl-2,4,6 octanoate de méthyle *29*, provenant de la glange uropygienne du Cygne, qui a un pouvoir rotatoire de $[\alpha]_D^{20} = -30{,}2°$, est unique et possède la configuration triméthyl-2D, 4D, 6D : A-II (**62**).

Nous avons vérifié que l'injection simultanée des esters *29*, provenant de la glande uropygienne des palmipèdes, et *28*, synthétique, augmentait l'intensité du pic A.

Analysé, dans les mêmes conditions, l'ester *27*, issu de l'acide bourgéanique, donne deux pics correspondants à A et à D d'intensité égale.

Il s'agit donc d'un mélange de deux épimères. Ceci était prévisible, puisqu'au cours de la réduction de l'acide éthylénique *24*, nous avons racémisé le carbone -2 sans modifier la configuration des carbones -4 et -6.

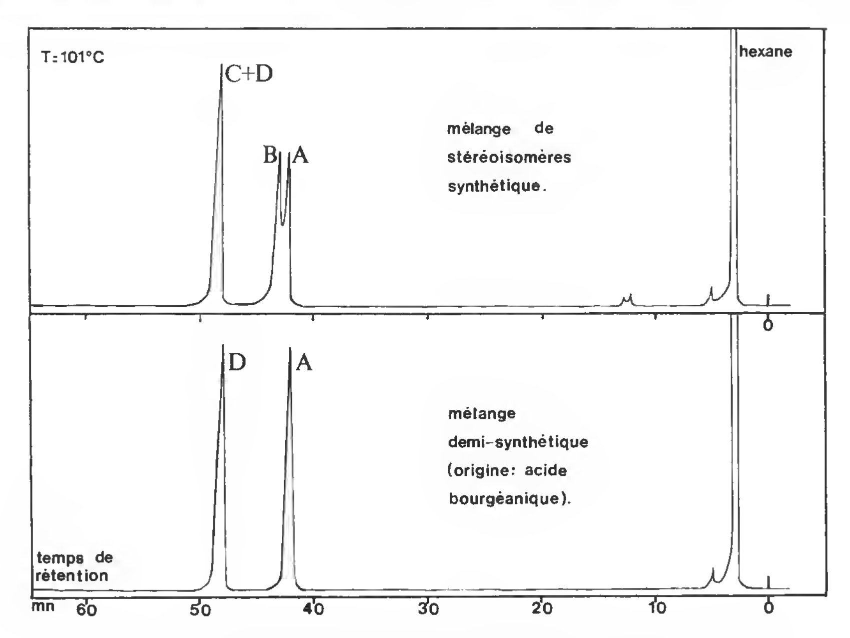


Fig. 13. — Chromatographie en phase vapeur sur colonne capillaire des triméthyl-2,4,6 octanoates de méthyle.

Ce résultat implique pour ce composé *27* la même configuration relative au niveau des carbones -4 et -6, D ou L.

Nous avons vu que l'ester *27* possède un pouvoir rotatoire de -11°. Odham a montré que, dans cette série, le pouvoir rotatoire était essentiellement dû au carbone -2 et antéiso (-6) et qu'un pouvoir rotatoire négatif indiquait une configuration absolue D. Nous considérerons que, dans le cas de *27*, la contribution au pouvoir rotatoire du carbone -2 est négligeable, ce carbone étant racémisé, et que la rotation optique observée est alors attribuable, pour l'essentiel, au carbone -6. Puisqu'elle est négative on en conclut que la configuration de ce carbone est D ; il en résulte que celle du carbone -4 est aussi D. L'ester *27* est donc constitué par le mélange des stéréoisomères A-II et D-I.

2. Configuration de l'acide hémibourgéanique

La configuration absolue des carbones -4 et -6 de l'ester *27* étant D, celle des carbones -4 et -6 de l'acide hémibourgéanique est D.

L'ensemble des résultats stéréochimiques conduisent à formuler pour l'acide hémibourgéanique deux structures spatiales possibles I ou II, représentées avec la convention de Fischer, la configuration relative des carbones -2 et -3 étant *érythro* (D, D) ou (L, L) et la configuration absolue des carbones -4 et -6 étant D.

I II

Pour décider laquelle de ces deux formules I ou II est représentative, nous allons examiner les conformères de chacun de ces isomères *thréo*-3,4 (I) et *érythro*-3,4 (II), figurés avec la convention de Newman.

(I) a b c

(II)

Pour chaque isomère, le conformère le plus stable, donc le plus probable, sera celui où les deux groupements volumineux qui sont les deux extrémités de la chaîne seront anti (b). On remarque que pour le conformère ainsi privilégié de I les deux protons H_β et H_γ sont gauches et que pour celui de II ces deux protons sont anti.

On doit donc attendre une grande constante de couplage en RMN entre ces deux protons si l'isomère naturel est II ($\sim$ 12 Hz) et une petite s'il est I ($\sim$ 2 Hz), puisqu'elle dépend du conformère le plus probable.

La constante de couplage observée expérimentalement est de 2,5 Hz ce qui permet de sélectionner la structure I. Mais ces considérations étant délicates nous avons eu recours à l'analyse de la structure cristalline de l'acide bourgéanique par les rayons X.

3. Structure cristalline de l'acide bourgéanique

La configuration relative des carbones asymétriques a été complétée par la résolution de la structure cristalline (**63**). Les cristaux, formés dans le méthanol, se présentent en longue plaquettes friables donnant des réflexions de mauvaise mosaïcité. Le système cristallin est monoclinique, le groupe spatial est $P2_1$. Il y a deux molécules dans la maille élémentaire dont les dimensions sont : a = 12,84, b = 7,91, c = 13,37 Å ; β = 116,8°.

La structure a été résolue par les méthodes directes (**64**) et affinée par les moindres carrés jusqu'au facteur d'accord de 10 %. Pour chacune des deux entités composant la molécule, la configuration des deux derniers carbones asymétriques est l'inverse de celle des deux premiers et c'est donc la structure I (schéma précédent) qu'il faut attribuer à l'acide hémibourgéanique.

La vue en perspective de l'acide bourgéanique est illustrée par la figure 14 (les atomes d'oxygène sont portés en noir, ceux de carbone en blanc et ceux d'hydrogène ne sont pas représentés).

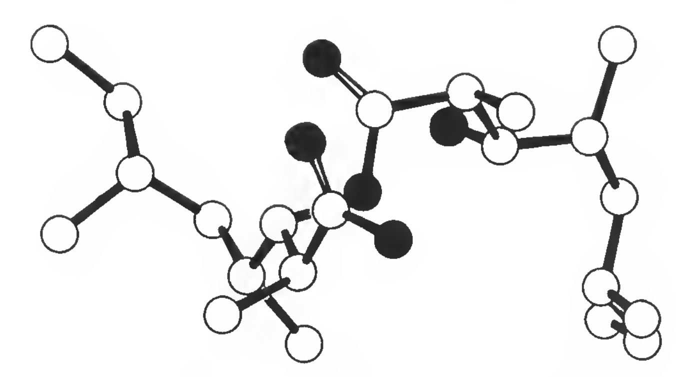


FIG. 14. — Structure cristalline de l'acide bourgéanique.

Nous avons vérifié que les valeurs calculées pour les distances interatomiques sont normales.

```
                                                                      1,34 O
                                                           C 1,53  1,53 C
                                   O                           C      1,19 O
                               1,45|                       1,55|
C 1,50 C 1,63 C 1,50 C 1,58 C 1,48 C 1,56 C 1,51 C 1,36 O 1,51 C 1,52 C 1,51 C 1,49 C 1,55 C 1,54 C
          1,56|          1,55|        1,58|  1,21||               1,56|          1,59|
              C              C            C      O                    C              C
```

L'acide bourgéanique peut donc être défini, avec la convention d'Ingold, comme l'acide triméthyl-2S, 4R, 6R (hydroxy-3'S triméthyl-2'S, 4'R, 6'R octanoyloxy)-3S octanoïque.

La structure de l'acide bourgéanique peut être rapprochée d'un point de vue formel

de celle de l'acide di-L-β-hydroxydécanoïque *30*, isolé sous forme de dirhamnoside de *Pseudomonas aeruginosa* (**65**). Ces deux composés sont, en effet, formés par l'estérification d'une molécule d'un acide β-alcool par une deuxième.

$CH_3-(CH_2)_6-CH(OR)-CH_2-COO-CH(CH_2-COOH)-(CH_2)_6-CH_3$

30

32

Les nombreuses ramifications méthyles de l'acide bourgéanique rappellent celles de l'acide mycolipénique de *Mycobacterium tuberculosis* (**66**), et celles des acides des glandes uropygiennes des Palmipèdes. Un régulateur de croissance isolé récemment d'un Champignon par Sassa (**67**) : l'acide radiclonique *31* possède un système semblable de ramications, de même que le portentol *32*, métabolite de deux Lichens du genre *Roccella* (**68**).

$CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH(CH_2OH)-CH_2-CH(CH_3)-CH=C(CH_3)-CH=C(COOH)-CH_2-CH(CH_3)-COOH$

31

Les ramifications méthyles de ces substances ayant des origines biogénétiques diverses selon les cas, nous avons tenté de définir par quelle voie elles étaient formées dans celui de l'acide bourgéanique.

III. BIOSYNTHÈSE DE L'ACIDE BOURGÉANIQUE

La connaissance du mécanisme d'élaboration des métabolites chez les Lichens est intéressante à plusieurs titres :

— Nombreux de ces composés leur sont propres. C'est le cas des depsides, que l'on ne trouve pratiquement que dans ce groupe végétal.

— Lorsque des composés similaires se rencontrent à la fois chez les Lichens et chez les Champignons, il est utile de comparer les processus biogénétiques.

— Mais, surtout, ces études apportent des éléments précieux à la compréhension de la biochimie de la symbiose : elles doivent permettre, en effet, de préciser le rôle de chacun des symbions (Algue et Champignon) dans la genèse et l'utilisation des métabolites secondaires.

La biosynthèse des substances chimiques des Lichens est restée longtemps à l'état d'hypothèse et ce n'est que récemment que des preuves expérimentales ont été apportées. Ceci s'explique vraisemblablement par la lente croissance des Lichens, comme de leurs Champignons lichénisants, qui paraissait être un handicap insurmontable.

L'examen de la structure de l'acide bourgéanique conduit à deux constatations :

— c'est un « depside » formé par l'estérification entre deux molécules d'un acide-alcool aliphatique ;

— cet acide-alcool porte des ramifications méthyles.

Aussi, allons-nous présenter rapidement les conceptions concernant la biosynthèse des depsides, constituants caractéristiques des Lichens, ainsi que celle des acides ramifiés, avant d'aborder le cas de l'acide bourgéanique.

A. — Biosynthèse des depsides

Les depsides sont des esters formés entre la fonction carboxyle d'un acide di- ou trihydroxybenzoïque et la fonction phénol d'une molécule du même genre. Le premier connu et le plus simple des depsides est l'acide lécanorique *33*, qui est synthétisé par de nombreuses espèces de Lichens.

CH_3 CO—O OH HO OH COOH CH_3

33

Cet acide est le produit de l'O-acylation d'une molécule d'acide orsellinique par une deuxième.

Le mécanisme de cette estérification *in vivo* n'est pas clair à l'heure actuelle. Certains auteurs suggèrent que le partenaire Algue condense enzymatiquement les unités

monocycliques synthétisées par le Champignon (**69**). Ce raisonnement est étayé par le fait que les Champignons libres synthétisent des unités aromatiques monocycliques (acide orsellinique), alors que les Lichens sont capables de synthétiser des unités bicycliques ou tricycliques (acides lécanorique ou gyrophorique).

Mais le Champignon peut très bien avoir tous les enzymes qui participent à la fois à la synthèse des unités monocycliques et à leur couplage, sans doute sous forme de thioesters, tels que l'orsellinyl-coenzyme A. Le processus global peut aussi avoir lieu dans le Champignon sur un seul multienzyme, constitué par une association complexe de deux, trois ou quatre synthétases de l'acide orsellinique, d'une façon permettant la condensation directe des monomères liés aux enzymes. L'isolement récent (**70**) de l'acide lécanorique dans un Champignon du genre *Piricularia*, parasite des Graminées, renforce cette conception.

CH_3 CO·SCoA HO OH + HO OH CO·SCoA CH_3 ⟶ Ac. lécanorique CoA $\xrightarrow{H_2O}$ Ac. lécanorique

Les premières théories pour la biosynthèse de l'acide orsellinique (**71**, **72**) le faisaient dériver des oses.

Cependant, dès 1907, Collie (**73**) avait exprimé l'hypothèse de la formation naturelle des composés phénoliques, par cyclisation d'une chaîne poly β-cétonique provenant de la condensation d'unités acétiques. Cette théorie, reprise de façon indépendante par Birch (**74**) en 1953, fut testée pour la première fois (**75**) en 1955 dans le cas de l'acide hydroxy-2 méthyl-6 benzoïque synthétisé par *Penicillium griseofulvum*.

Les expériences sur la biosynthèse de l'acide orsellinique *34* ont montré qu'il provenait de la condensation tête à queue de quatre unités acétiques. Mosbach (**76**), en cultivant *Chaetonium cochliodes* sur un milieu contenant de l'acide acétique — 1 ^{14}C a obtenu de l'acide orsellinique (métabolite de ce Champignon) ayant la distribution requise des carbones marqués.

4 CH_3–C*OOH ⟶ CH_3 C*OOH O O ⟶ CH_3 C*OOH HO OH

34

On sait depuis (**77**) que l'acide acétique intervient seulement pour l'initiation de la chaîne, les séquences suivantes utilisent l'acide malonique, issu de la carboxylation de l'acide acétique et décarboxylé ultérieurement.

Il faut noter, en outre, que les produits utilisés *in vivo* ne sont pas les acides acétique et malonique libres, mais les acétyl- et malonyl-coenzymes A plus réactifs. Cette voie de

biosynthèse est communément appelée voie acétique-polymalonique ou voie poly-β-céto-nique.

En 1964, Mosbach (**78**) réalisait la première démonstration de biosynthèse dans le cas des Lichens, en étudiant la formation de l'acide gyrophorique *35* (tridepside formé par trois molécules d'acide orsellinique) par *Umbilicaria pustulata.* Il prouvait, par le marquage au carbone 14, que l'acide orsellinique intermédiaire est biosynthétisé à partir d'une unité acétyl-coenzyme A et de trois unités malonyl-coenzyme A.

35

Parallèlement, Shibata (**79**) obtenait l'incorporation d'AcOH radioactif par le Lichen *Parmelia tinctorum* pour former l'acide lécanorique.

Ces expériences prouvaient l'origine acétique polymalonique des acides orsellinique et lécanorique.

Les depsides des Lichens présentent une grande variété de structures, qui sont cependant reliées à celle de l'acide lécanorique.

1. Composés comportant une chaîne initiale plus longue

Il existe une classe de depsides où R et R′ ne sont plus des méthyles, comme dans l'acide lécanorique, mais des groupes linéaires en C_3, C_5 ou même C_7 souvent saturés.

36

C'est le cas, par exemple, de l'acide anziaique *36* (R = R' = C_5H_{11}) (**80**).

On peut supposer alors une voie biogénétique analogue à celle décrite précédemment, mais où l'initiateur de la chaîne serait, au lieu de l'acide acétique, un acide linéaire saturé plus long (voie a).

Mais on ne peut éliminer une autre possibilité (voie b) où l'initiateur serait l'acide acétique et où la réduction de la chaîne alcanoyle s'effectuerait après la cyclisation. Ceci permettrait d'expliquer la biosynthèse de composés comme l'acide olivétorique *37* (**81**) où le radial R conserve un groupe carbonyle dans une position déterminée par une origine poly-β-cétonique. Cependant l'existence de depsides, comme l'acide miriquidique *38* (**82**) où le radical R conserve un carbonyle dans une position non explicable par une origine poly-β-cétonique, rend cette question peu claire. Il est de toute façon possible, au moins dans ce dernier cas, que le carbonyle provienne d'une oxydation ultérieure.

2. **Introduction de substituants supplémentaires à des composés dérivés de la voie acétique**

Un certain nombre de depsides contiennent des atomes de carbone en plus de ceux que laissait prévoir une biosynthèse acétique-malonique. Citons, par exemple, l'acide barbatique *39* et l'atranorine *40*.

39

40

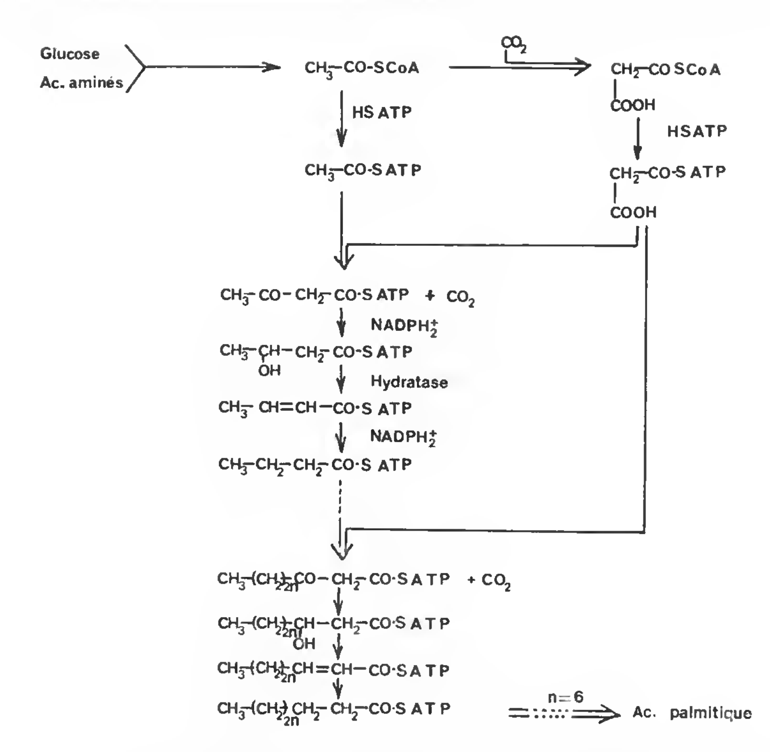
Shibata (**79**, **83**) a prouvé, à l'aide de traceurs radioactifs, l'origine du groupe méthyle et du groupe formyle supplémentaires de l'atranorine : ils proviennent de l'addition d'unités en C_2, telles que l'acide formique ou le méthyle de la méthionine.

De plus, cette C-méthylation s'effectue sur la chaîne poly-β-cétonique avant que la cyclisation ne se soit produite, puisque l'acide orsellinique n'est pas incorporé alors que l'acide méthyl-3 orsellinique est incorporé.

B. — Biosynthèse des acides aliphatiques ramifiés

Les organismes vivants produisent une grande variété d'acides aliphatiques ramifiés, les substituants pouvant être de simples groupes méthyles ou de longues chaînes. Ces acides se rencontrent dans les suints, les graisses animales, les lipides de diverses bactéries, les champignons, etc.

Les acides aliphatiques saturés linéaires, constituants des cires animales ou végétales, comme l'acide palmitique, sont biosynthétisés (**84**) par élongation au moyen de malonyl-CoA d'une chaîne initiée par l'acétyl-CoA et réduction des carbonyles, selon le schéma suivant :



Le cas des acides aliphatiques à ramifications méthyles paraît plus complexe : la présence d'un groupe $>CH\text{-}CH_3$ dans un composé, dont l'origine apparente est une combinaison linéaire d'unités en C_2, n'est pas toujours expliquée immédiatement. Il y a deux origines bien établies pour de tels groupes.

1. L'incorporation d'unités propioniques dans une chaîne en cours d'élongation

Cette voie rend compte de la formation d'acides gras méthylés en position 2, 4, 6, etc., tels les acides α-méthylbutyrique, mycocérosique et les acides caractéristiques des glandes uropygiennes des palmipèdes.

Les unités propioniques sont alors incorporées de façon analogue aux unités acétiques, comme nous l'avons vu précédemment, sous forme de méthylmalonyl-coenzyme A, et les carbonyles sont réduits.

L'exemple le plus simple est celui de l'acide méthyl-2 butyrique *41* produit par *Ascaris lumbricoides* (**85**) par condensation d'une unité acétique et d'une unité propionique.

$$\begin{array}{ccc} CH_3-COOH & & CH_3-CH_2-COOH \\ \downarrow & & \downarrow \\ CH_3-CO\,SCoA & + & CH_3-\underset{}{CH}(COOH)-CO\,SCoA \end{array}$$

$$\longrightarrow CH_3-CO-CH(CH_3)-COSCoA \longrightarrow CH_3-CH_2-CH(CH_3)-COOH \quad \underline{41}$$

Les microorganismes sont capables de réaliser de telles biosynthèses. GASTAMBIDE-ODIER et LEDERER (**86**) ont montré que *Mycobacterium tuberculosis* incorporait l'acide propionique marqué (1-^{14}C — 3-^{3}H) pour former l'acide mycocérosique *42*, selon le schéma suivant :

$$CH_3{-}(CH_2)_{19}{-}COOH + 4\,{}^{*}CH_3{-}CH_2{-}{}^{\circ}COOH \longrightarrow CH_3{-}(CH_2)_{19}{-}CH_2{-}CH({}^{*}CH_3){-}{}^{\circ}CH_2{-}CH({}^{*}CH_3){-}{}^{\circ}CH_2{-}CH({}^{*}CH_3){-}{}^{\circ}CH_2{-}CH({}^{*}CH_3){-}{}^{\circ}COOH$$

<u>42</u>

Des organismes supérieurs utilisent aussi cette voie de synthèse. LEDERER et coll. (**87**) ont déterminé que l'acide tétraméthyl-2, 4, 6, 8 décanoïque *43*, caractéristique de la glande uropygienne des Palmipèdes, est biosynthétisé par condensation d'une unité acétique et de quatre unités propioniques.

$$CH_3{-}COSCoA + 4\,CH_2({}^{*}CH_3){-}COSCoA \longrightarrow CH_3{-}CH_2{-}CH({}^{*}CH_3){-}CH_2{-}CH({}^{*}CH_3){-}CH_2{-}CH({}^{*}CH_3){-}CH_2{-}CH({}^{*}CH_3){-}COOH$$

<u>43</u>

Les expériences de LEDERER ont été effectuées sur l'Oie domestique. Nous avons montré (**88**) qu'il existe dans la glande uropygienne de l'Oie domestique, en plus de cet acide tétraméthyl-2, 4, 6, 8 décanoïque, l'acide triméthyl-2, 4, 6 octanoïque en faible quantité, acide isolé et caractérisé auparavant par ODHAM (**62**) dans le cas d'un autre Palmipède : le Cygne muet.

$$CH_3{-}CH_2{-}CH(CH_3){-}CH_2{-}CH(CH_3){-}CH_2{-}CH(CH_3){-}COOH$$

$$CH_3{-}CH_2{-}CH(CH_3){-}CH_2{-}CH(CH_3){-}CH(OH){-}CH(CH_3){-}COOH$$

<u>12</u>

La biosynthèse de ce composé fait intervenir une unité acétique et trois unités propioniques. Nous avons vu que sa structure est, au degré d'oxydation près, identique à celle de l'acide hémibourgéanique *12*.

2. La méthylation d'un méthylène actif d'une chaîne d'origine poly-β-cétonique

Cette voie permet l'incorporation d'un groupe méthyle sur une chaîne de biosynthèse acétique polymalonique. Plusieurs molécules, comme l'acide formique, la choline ou la méthionine, peuvent fournir ce groupe, mais on considère qu'en dernier lieu c'est la S-adenosyl-méthionine qui transfère le méthyle à un atome de carbone insaturé.

$$-C{=}C- \quad CH_3{-}\overset{+}{S}- \longrightarrow -C(CH_3){=}C- \xrightarrow{2H} -CH(CH_3){-}CH-$$

Deux mécanismes (**89**) peuvent être envisagés :

— L'incorporation du groupe méthyle s'effectue sur une chaîne grasse au niveau d'une liaison éthylénique non activée. Celle-ci est créée par la réduction partielle du carbonyle formé par la synthèse poly-β-cétonique. LENNARZ (**90**) et LEDERER (**91**) ont mis ce mécanisme en évidence pour la formation de l'acide tuberculostéarique *44* chez les Mycobactéries :

$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$ + $CH_3-\overset{+}{S}(\text{Adénosyle})-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

↓ 2H

$CH_3-(CH_2)_7-CH(CH_3)-CH_2-(CH_2)_7-COOH$ + $(\text{Adénosyle})S-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

44

— Le groupe méthyle s'incorpore sur la chaîne au niveau d'une double liaison activée par un atome donneur d'électrons (oxygène). Cette double liaison serait formée par l'énolisation d'un carbonyle issu de la biosynthèse acétique-polymalonique. Le mécanisme serait alors semblable à celui envisagé pour la biosynthèse des composés aromatiques C-méthylés, la réduction des carbonyles intervenant ultérieurement.

$-CH_2-C(=O)- \longleftrightarrow -CH=C(OH)- \xrightarrow{CH_3} -CH(CH_3)-C(=O)- \xrightarrow{\text{Réd.}} -CH(CH_3)-CH_2-$

LEDERER (**92**) a démontré ce mécanisme dans le cas, entre autres, de la sclérotiorine *45*, métabolite de *Penicillium sclerotiorum*.

$CH_3-CH_2-CH(^*CH_3)-CH=C(^*CH_3)-CH=CH-$[bicycle: Cl, O, O, $OCO-CH_3$, $^*CH_3$]

45

Ces deux mécanismes ont été prouvés par le transfert des trois atomes de deutérium de la [Me-$^2H_3$] méthionine dans la seconde hypothèse et de deux seulement dans la première.

C. — BIOSYNTHÈSE DE L'ACIDE BOURGÉANIQUE

L'acide bourgéanique est l'ester formé par O-acylation d'une molécule d'acide hémibourgéanique par une deuxième molécule de cet acide. On retrouve là un processus commun aux Lichens qui synthétisent habituellement, comme nous l'avons vu, les depsides.

Les données générales, décrites précédemment, conduisent à formuler deux hypothèses biogénétiques pour l'acide hémibourgéanique : il serait formé :

— soit à partir d'une unité acétique et de trois unités propioniques,

$$CH_3{-}COOH + 3\ \underset{\displaystyle CH_3}{CH_2}{-}\overset{*}{C}OOH \xrightarrow{\text{Réd.}} CH_3{-}CH_2{-}\underset{\displaystyle CH_3}{CH}{-}\overset{*}{C}H_2{-}\underset{\displaystyle CH_3}{CH}{-}\overset{\displaystyle OH}{\overset{*}{C}H}{-}\underset{\displaystyle CH_3}{CH}{-}\overset{*}{C}OOH$$

— soit par condensation de quatre unités acétiques, suivie de méthylation par la méthionine.

$$4\ CH_3{-}\overset{*}{C}OOH \longrightarrow CH_3{-}\overset{*}{C}O{-}\underset{\uparrow C_1}{CH_2}{-}\overset{*}{C}O{-}\underset{\uparrow C_1}{CH_2}{-}\overset{*}{C}O{-}\underset{\uparrow C_1}{CH_2}{-}\overset{*}{C}OOH$$

$$\xrightarrow{\text{Réduction}} CH_3{-}\overset{*}{C}H_2{-}\underset{\displaystyle CH_3}{CH}{-}\overset{*}{C}H_2{-}\underset{\displaystyle CH_3}{CH}{-}\overset{\displaystyle OH}{\overset{*}{C}H}{-}\underset{\displaystyle CH_3}{CH}{-}\overset{*}{C}OOH$$

L'étude de la biosynthèse au moyen des précurseurs radioactifs permet de choisir entre ces deux hypothèses.

Méthode

Nous avons étudié la biogenèse de l'acide bourgéanique à l'aide de [1-^{14}C] acétate de sodium, [1-^{14}C] propionate de sodium et de L [CH_3-^{14}C] méthionine.

Les expériences ont été effectuées avec le Lichen *Desmaziera evernioides* (Nyl.) Foll. et Hun. qui est, parmi les diverses espèces produisant cet acide, celui qui fut, pour nous, le plus accessible. De plus, cette espèce renferme peu de substances secondaires et l'isolement de l'acide bourgéanique y est relativement facile. Cette étude a été menée avec du matériel végétal fraîchement récolté au printemps et au début de l'été, ceci à la suite de remarques de divers auteurs qui ont constaté une croissance meilleure des Lichens à cette période de l'année.

La méthode a consisté à mettre le Lichen en suspension dans une solution nutritive (Czapeck-Dox stérile) contenant le précurseur (100 µCi) et à l'agiter pendant 48 heures sous éclairage.

Le Lichen a été ensuite lavé abondamment à l'eau, séché et extrait à l'acétone.

L'acide bourgéanique isolé est purifié par cristallisations répétées jusqu'à radioactivité constante.

Résultats

Les valeurs des radioactivités de l'acide bourgéanique et les pourcentages d'incorporation, selon les différents essais, sont consignés dans le tableau suivant :

Précurseur	Radioactivité dpm/m.mole . 10^{-6}	Incorporation %
[1—^{14}C] CH_3CO_2Na	3,09	1,17
[1—^{14}C] $CH_3CH_2CO_2Na$	0,04	0,01
[CH_3—^{14}C] méthionine	46,32	11,33

Ces résultats montrent que l'acide acétique et la méthionine sont incorporés et que l'acide propionique ne l'est pas de façon significative.

Dégradations de l'acide bourgéanique radioactif

L'acide bourgéanique provenant de l'expérience réalisée avec la méthionine est dilué avec de l'acide inerte. On obtient alors une marque de $4{,}552.10^6$ dpm/mM. Afin de préciser la localisation des carbones radioactifs cet acide est soumis à l'oxydation selon Kuhn-Roth : cette réaction fournit de l'acide acétique et du gaz carbonique selon le schéma suivant :

$$CH_3-CH_2-CH(^*CH_3)-CH_2-CH(^*CH_3)-CH(OH)-CH(^*CH_3)-CO-O-CH[CH(^*CH_3)-COOH]-CH(^*CH_3)-CH_2-CH(^*CH_3)-CH_2-CH_3 \longrightarrow 8\,^*CH_3-COOH + 6\,CO_2$$

L'acide acétique radioactif obtenu est isolé sous forme de son *para*-phénylphénacylate que l'on purifie par chromatographie sur plaque de gel de silice. Ce dérivé possède une marque de $5{,}74.10^5$ dpm/mM, soit 100,9 % de la radioactivité théorique ($5{,}69.10^5$ dpm/mM), puisqu'une mole d'acide bourgéanique conduit à huit moles d'acide acétique.

Le dérivé phénacylé est dilué avec du dérivé non actif. La nouvelle marque est de $1{,}44.10^5$ dpm/mM.

L'acide acétique radioactif est ensuite régénéré par saponification et distillation, puis dégradé par la réaction de Schmidt en CO_2 et méthylamine, captée sous forme de N-(dinitro-2,4 phényl) méthylamine.

L'anhydride carbonique libéré dans cette réaction ne présente pratiquement pas d'activité, tandis que la méthylamine est radioactive : elle présente une activité de $1{,}40.10^5$ dpm/mM, soit 97,2 % de la radioactivité théorique.

Le bilan de ces dégradations, représentées dans le schéma suivant, indique la présence exclusive de la radioactivité dans les groupes méthyles.

$$CH_3-CH_2-CH(^*CH_3)-CH_2-CH(^*CH_3)-CH(OH)-CH(^*CH_3)-CO-O-CH[CH(^*CH_3)-COOH]-CH(^*CH_3)-CH_2-CH(^*CH_3)-CH_2-CH_3 \quad \text{Act.:100}$$

Oxydation de Kuhn-Roth ↓

$^*CH_3-COOH \longrightarrow pC_6H_5-C_6H_4-CO-CH_2-O-OC-{}^*CH_3$ { Cal.: 12,50 ; Tr. : 12,61 }

Réaction de Schmidt :

$^*CH_3-NH_2$; CO_2 { Cal.: 0 ; Tr. : 0 }

↓

$^*CH_3-NH$-2,4 DNP { Cal.: 12,50 ; Tr. : 12,15 }

Les valeurs portées indiquent les activités spécifiques molaires exprimées en % de celle de l'acide bourgéanique.

L'ensemble des résultats vérifie la deuxième hypothèse biogénétique :

L'acide bourgéanique est biosynthétisé par C-méthylation d'une chaîne acétique-polymalonique.

Cette biosynthèse est donc du même type que celle observée pour le portentol, métabolite de Lichens du genre *Roccella*, dont la structure semblait d'origine polypropionique mais qui est, ainsi que l'a montré OVERTON (**94**), formé à partir d'acide acétique et de méthionine.

Remarquons que *Ramalina* et *Roccella* appartiennent à des familles très éloignées du point de vue de la classification botanique. Par ailleurs, il est intéressant de constater que les *Roccella*, qui produisent le portentol, et *Ramalina evernioides*, qui synthétise l'acide bourgéanique, renferment des proportions importantes de sulfate de choline. On peut se demander, dans ces conditions, si le sulfate de choline n'a pas un rôle d'agent méthylant dans ces organismes.

On peut aussi rapprocher l'acide bourgéanique de depsides, comme l'acide lécanorique, puisqu'ils sont biosynthétisés par la voie acétique-polymalonique et ont un précurseur commun formé de quatre unités en C_2. La méthylation de la chaîne poly-β-cétonique et la réduction des carbonyles constitueraient, dans le cas de l'acide bourgéanique, une déviation de la voie habituelle.

Acide bourgéanique — Acide lécanorique

On connaît cependant différents depsides comme l'acide barbatique (**8**) et la phénaretine (**95**), qui ont des degrés de C-méthylation intermédiaires entre ceux des acides lécanorique et bourgéanique. Cette constatation conduit à l'interprétation suivante : l'acide bourgéanique proviendrait d'une C-méthylation excessive du précurseur qui empêcherait sa cyclisation et celui-ci subirait alors une réduction des groupes carbonyles.

L'acide bourgéanique présente deux différences essentielles avec l'acide lécanorique :

— il est C méthylé,

— il est réduit.

Nous avons vu comment la C-méthylation pouvait s'insérer dans le mécanisme de formation des depsides, nous allons examiner maintenant le problème de la réduction.

La voie acétique-polymalonique explique, non seulement, la formation des composés aromatiques, mais aussi celle des acides gras naturels, comme l'acide palmitique. La seule différence est dans la nécessité d'un agent réducteur, le $NADPH_2$, pour la synthèse des acides gras.

Réd.

acide lécanorique

acide barbalique

phénarctine

acide bourgéanique

Mosbach (**96**) a montré que, dans le cas du Champignon *Penicillium baarnense* qui synthétise de l'acide palmitique et de l'acide orsellinique, donc un composé aliphatique et un aromatique, le rapport entre les acides formés n'était pas constant et pouvait être soumis à régulation. Il envisage que c'est le taux de $NADPH_2$, présent dans la plante, qui est le régulateur : une grande concentration de ce produit orienterait vers la synthèse d'acides aliphatiques.

Or, les Lichens accumulent de fortes concentrations de métabolites secondaires, le plus souvent aromatiques (par exemple, l'acide lécanorique constitue jusqu'à 20 % du poids de certaines espèces) ; par ailleurs, ce sont des organismes à croissance très lente, et Mosbach considère ce fait comme une adaptation à une déficience en azote.

De ces données, une conclusion semble se dégager : les Lichens, pauvres en azote, auraient des taux faibles en $NADPH_2$, et orienteraient leurs synthèses vers la formation de métabolites aromatiques, ce qu'on constate le plus souvent.

La formation de l'acide bourgéanique pourrait s'interpréter comme due à un meilleur métabolisme de l'azote par les Lichens qui le synthétisent.

CONCLUSION

A l'aide de techniques chimiques et spectrométriques, nous avons attribué à l'acide bourgéanique, nouveau métabolite des Lichens, la structure acide triméthyl- 2S, 4R, 6R (hydroxy-3'S triméthyl-2'S, 4'R, 6'R octanoyloxy)-3S octanoïque.

Nous avons montré que cet acide, qui est le premier « depside aliphatique » isolé des Lichens, est biosynthétisé par C-méthylation d'une chaîne issue de la voie acétique-polymalonique. On remarquera que le degré de C-méthylation est considérable.

HALE (**97**) a suggéré que le niveau d'évolution des Lichens pouvait être relié au degré d'O-méthylation des substances qu'ils renferment : un genre plus évolué synthétiserait des composés plus O-méthylés. On peut se demander si la C-méthylation a une signification analogue.

Le fait que l'acide bourgéanique ait été rencontré jusqu'à présent dans des familles (Ramalinacées, Cladoniacées) considérées par les botanistes comme évoluées va dans ce sens. Cependant, en l'absence d'études concernant la fréquence de C-méthylation en fonction du niveau d'évolution des Lichens et les composants chimiques de Lichens fossiles, il est difficile de savoir si la présence d'acide bourgéanique et, de façon plus générale, de substance fortement C-méthylées, est un caractère primitif ou évolué.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les points de fusion, non corrigés, ont été déterminés au microscope à platine chauffante Kofler.

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Perkin-Elmer 141.

Les microanalyses sont dues au Service de Microanalyse du Laboratoire de Chimie organique de la Faculté des Sciences de Paris VI (Service de M. DORME).

Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un spectrographe Perkin-Elmer 137 E, en pastille de KBr pour les solides et entre lames de KBr pour les liquides.

Les spectres de RMN du proton ont été réalisés avec un spectromètre Varian A 60 et ceux du C-13 sur un appareil Varian XL 100. Les déplacements chimiques (δ) sont mesurés en ppm par rapport au TMS, référence interne. L'allure des signaux est décrite en abrégé avec la convention : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet et m = multiplet. Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz.

Les spectres de masse ont été effectuées avec un spectrographe Thomson-Houston THN 208.

Les analyses par chromatographie en phase vapeur ont été faites sur un chromatographe Girdel, type 75.FD.2 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

Les échantillons radioactifs ont été pesés sur une microbalance Mettler M 5. SA/M5. Les mesures de radioactivité ont été effectuées sur un compteur à scintillation « Nuclear Chicago », modèle 6860 muni d'un dispositif de standardisation externe.

Isolement de l'acide bourgéanique (*Desmaziera evernioides*)

Le Lichen *Desmaziera evernioides* (Nyl.) Foll. et Hun. (200 g), récolté en Bretagne en été, séché à l'air et broyé, est extrait en continu au Soxhlet par de l'hexane pendant 3 h. Par évaporation du solvant, on recueille 8,78 g d'un solide jaunâtre qui, recristallisé dans l'hexane, fournit 5,32 g d'acide bourgéanique, F : 120-121°C, puis un deuxième jet (1,13 g) du même acide, F : 115-117°C.

Ces fractions sont rassemblées, dissoutes dans du méthanol, traitées par du noir végétal et recristallisées dans un mélange méthanol-eau (50/50). Le produit est cristallisé à nouveau dans l'hexane et fournit l'acide bourgéanique pur *1* (5,80 g), F : 125-126°C. Le pourcentage d'acide bourgéanique dans le Lichen est estime à 3 %. Son pouvoir rotatoire, pris dans le chloroforme, est : $\left[\alpha\right]_D^{21} = +7°$ (c = 1,003).

Analyse $C_{22}H_{42}O_5$: Calc. % : C 68,36 H 10,95.
Tr. : 68,55 10,70.

IR : ν_{OH} = 3420 cm^{-1} : ν_{CO} = 1743 et 1720 cm^{-1}.

RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 6,77 s 2H (OH) ; 5,23 d de d (J_1 = 2,5 ; J_2 = 10) 1H (>CH-O-CO) ; 3,75 d de d (J_1 = 2,5 ; J_2 = 10) 1H (>CH-OH) ; 2,72 m 2H (>CH-COO) ; 2 à 0,70 massif 36H.

Le Lichen est ensuite extrait pendant 24 h par de l'éthanol. On obtient, après évaporation du solvant, un résidu noirâtre de 16 g sous forme de liquide visqueux. Celui-ci est

traité plusieurs fois par de l'acétone à chaud pour éliminer la chlorophylle, puis est repris par du méthanol à chaud. Par refroidissement il précipite 0,320 g d'un solide blanchâtre mal cristallisé, fondant au voisinage de 190°C. Le spectre infrarouge montre qu'il s'agit d'un mélange d'acides gras polyhydroxylés analogues de l'acide ventosique.

IR : ν_{OH} = 3300 et 3240 (ép.) cm^{-1} : ν_{CO} = 1720 cm^{-1} ; bandes à : 1470, 1450, 1070, 1055, 1030, 940 et 725 cm^{-1}.

De la solution méthanolique refroidie cristallise lentement 0,330 g de sulfate de choline *3* en microcristaux incolores. F : 300°C (Litt. 300°C) (**8**).

IR : bandes à : 1480, 1265, 1230, 1215, 1040, 960, 905, 763 et 683 cm^{-1}.

RMN (D_2O, sel de Na de l'ac. triméthylsilylpropanosulfonique) : δ (ppm) = 4,53 m 2H (CH_2O) ; 3,75 m 2H (CH_2N^+) ; 3,25 s 9H (CH_3N^+).

Par concentration de la solution méthanolique et addition d'une petite quantité d'acétone, il précipite 1,10 g de D-arabitol *2*, F : 102-103°C (Litt. 102-103°C) (**8**), qui a été caractérisé par son spectre infrarouge.

Isolement de l'acide bourgéanique (*Ramalina bourgeana*)

150 g du Lichen *Ramalina bourgeana* Mont., récoltés au printemps à Las Galetas, îles Canaries, séchés à l'air, sont broyés, puis extraits en continu pendant 16 h au Soxhlet par de l'acétone.

La solution acétonique laisse, après évaporation du solvant, un résidu brut de 5,03 g. Ce résidu est repris par de l'hexane. La fraction insoluble dans l'hexane fournit, après recristallisation dans l'acétone, 1,6 g (1,1 %) d'acide salazinique *6*, F : 270°C (déc.) (Litt. 260-280°C déc.) (**8**), caractérisé par ses spectres IR et de RMN.

IR : ν_{OH} = 3570 et 3300 cm^{-1} : ν_{CO} = 1770, 1743 et 1660 cm^{-1}.

RMN (DMSO-D_6) : δ (ppm) = 10,50 s 1H (CHO) ; 6,91 s 1H, 6,88 s 1H (H arom. + $-CH<^{OH}_{O-}$) ; 4,73 s 2H (CH_2OH) ; 2,48 s 6H (CH_3 arom.).

La solution hexanique laisse déposer au refroidissement 0,037 g (0,025 %) d'acide usnique *5*, cristaux jaunes, F : 200-202°C (Litt. 203°C) (**8**).

IR : ν_{CO} = 1690 et 1630 cm^{-1}. $[\alpha]^{21}_{D}$ = + 467° ($CHCl_3$, c = 0,72).

RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 5,97 s 1H (H arom.) ; 2,66 s 6H (2 CH_3CO) ; 2,10 s 3H (CH_3 arom.) ; 1,76 s 3H (CH_3).

Spectre de masse : M^+ = 344.

Par concentration de cette solution, il cristallise 0,620 g (0,4 %) d'acide bourgéanique. Recristallisé MeOH/H_2O (50/50). F : 124-125°C.

L'identité de ce produit avec celui provenant de *Desmaziera evernioides* a été établie par comparaison des spectres IR et de masse.

Le Lichen est ensuite extrait pendant 24 h par de l'éthanol. L'évaporation du solvant laisse une résine noirâtre (8,9 g).

Par cristallisation fractionnée, nous avons pu isoler 0,210 g d'acides gras polyhydroxylés, mélange comparable à celui obtenu avec le Lichen précédent, et du mannitol *7* (0,09 g), F : 164-167°C (Litt. 166-167°C) (**8**), caractérisé par son spectre infrarouge.

Bourgéanate de potassium *8* ($C_{22}H_{41}O_5K$)

A 0,271 g d'acide bourgéanique dissous dans 5 cm^3 d'éthanol, on ajoute 10 cm^3 d'une solution aqueuse de potasse à 25 %, à froid, et on abandonne le mélange 1 h à température ambiante. On filtre les cristaux formés, qui étant légèrement solubles dans l'eau, sont lavés avec le minimum d'eau distillée. On obtient, après séchage, 0,274 g de bourgéanate de potassium. (Rdt : 92 %), cristaux incolores fondant à 251°C avec décomposition.
IR : ν_{CO} = 1712 (ester) et 1590 (COOK) cm^{-1}.

Ester méthylique de l'acide bourgéanique *9* ($C_{23}H_{44}O_5$)

A une solution de 0,400 g d'acide bourgéanique dans 5 cm^3 d'éther, on ajoute une solution éthérée de diazométhane jusqu'à coloration jaune du milieu et on laisse reposer 12 h à température ambiante. La solution éthérée est lavée avec une solution de bicarbonate de sodium à 5 %, puis à l'eau jusqu'à neutralité, séchée au sulfate de sodium et évaporée pour donner 0,405 g de l'ester méthylique (Rdt : 97 %), liquide huileux.
IR : ν_{OH} = 3540 cm^{-1} ; ν_{CO} = 1745 cm^{-1} (large bande).
RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 5,19 d de d (J_1 = 3, J_2 = 9,5) 1H (CH-O-CO) ; 3,70 s 3H (OCH_3) 3,62 m 1H (CH-OH) ; 2,72 m 2H (>CH-CO), 2 à 0,80 massif 36H.
Masse : $M^+ + 1 = 401$.

Acide acétylbourgéanique *10* ($C_{24}H_{44}O_6$)

0,147 g d'acide bourgéanique sont dissous à froid dans 2 g de chlorure d'acétyle. Le mélange est gardé une nuit à température ambiante, puis est jeté sur de la glace. On extrait la solution par l'éther. La solution éthérée est lavée trois fois à l'eau distillée, séchée sur sulfate de sodium et évaporée. On recueille 0,152 g (93 %) de produit brut qui est purifié par chromatographie sur plaque de gel de silice (éluant acide acétique-toluène, 15/85). L'acide acétylbourgéanique est liquide.
IR : ν_{CO} = 1790 et 1745 cm^{-1}.
RMN ($CDCl_3$) δ (ppm) = 5,12 m 2H (>CH-O-CO) ; 2,80 m 2H (>CH-COO) ; 2,03 s 3H (CH_3COO) ; 1,90 à 0,80 massif 36H.

Acide déhydrobourgéanique *11* ($C_{22}H_{40}O_5$)

A une solution de 0,250 g d'acide bourgéanique dans 20 cm^3 d'acide acétique, on ajoute 0,15 g d'anhydride chromique en solution acétique et on porte à 50°C pendant 1/2 h. On ajoute ensuite de l'eau et extrait à l'éther. L'extrait éthéré est lavé à l'eau, séché et évaporé pour fournir 0,220 g (88 %) d'acide déhydrobourgéanique, huile incolore.
IR : ν_{CO} = 1740 et 1710 cm^{-1}.
RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 5,20 d de d (J_1 = 3, J_2 = 9) 1H (>CH-O-CO) ; 3,75 q (J = 7) 1H (CO-C*H*-CO) ; 2,83 m 2H (>CH-CO et >CH-COO) ; 1,75 à 0,75 massif 35H.
CH_3

Masse : $M^+ + 1 = 385$.

Acide hydroxy-3 triméthyl-2,4,6 octanoïque ou acide hémibourgéanique *12* ($C_{11}H_{22}O_3$)

A 2,083 g d'acide bourgéanique dissous dans 20 cm³ d'éthanol, on ajoute 10 g de potasse en solution dans 20 cm³ d'eau. Le mélange est porté à doux reflux pendant 1 h, puis refroidi à 0°C, acidifié par de l'acide chlorhydrique dilué et extrait plusieurs fois à l'éther. La phase éthérée, lavée une fois à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée, laisse un résidu de 2,043 g.

La chromatographie sur plaque de gel de silice (éluant acide acétique-toluène, 15/85) fait apparaître deux taches, dont l'une (Rf = 0,44) relativement intense et l'autre faible (Rf = 0,69). Ces deux produits sont séparés sur colonne de gel de silice (éluant acétone-hexane, 1/3). On recueille ainsi 1,822 g du produit majoritaire (Rdt : 83 %), c'est l'acide hémibourgéanique *12*. Liquide visqueux. $Eb_{0,9}$ = 154°C. $[\alpha]_D^{21}$ = — 3,2° ($CHCl_3$; c = 1,08).
IR : ν_{OH} = 3420 cm⁻¹ ; ν_{CO} = 1715 cm⁻¹.
RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 7,50 s 2H (OH) ; 3,72 d de d (J_1 = 2,5, J_2 = 8,5) 1H (C*H*-OH) ; 2,71 d de q 1H (J_d = 8,5, J_q = 7) (>C*H*-COOH) ; 2 à 0,80 massif 18H.
Masse : M^+ = 202.

Le produit minoritaire (0,09 g) est l'acide α-éthylénique formé par la déshydratation de l'acide précédent (Rdt : 4,5 %).
IR : ν_{CO} = 1690 cm⁻¹ ; $\nu_{C=C}$ = 1640 cm⁻¹. Masse : M^+ = 184.

Para-Phénylphénacylate de l'acide hémibourgéanique *13* ($C_{25}H_{32}O_4$)

0,350 g de l'acide *12* dissous dans 15 cm³ d'éthanol est neutralisé par une solution de soude à 5 % en présence de phénolphtaléine. On décolore la solution par addition d'une petite quantité de l'acide précédent, on ajoute 0,476 g de bromure de *p*-phénylphénacyle et on porte le mélange à reflux pendant 1 h. Par addition d'eau, après refroidissement, un solide amorphe précipite : il est chromatographié sur plaque de gel de silice (éluant éther de pétrole-acétate d'éthyle, 75/25). On isole ainsi 0,506 g de *p*-phénylphénacylate *13* (Rdt : 74 %). F : 80-81°C (MeOH, H_2O).
IR : ν_{OH} = 3470 cm⁻¹ ; ν_{CO} = 1741 (ester) et 1683 (cétone) cm⁻¹ : bandes à 1600, 1242, 1170, 973 et 768 cm⁻¹.
RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 7,91 q (J = 8,5) 4H ; 7,58 m 5H (arom.) ; 5,50 s 2H (-OCH_2CO) ; 3,80 d de d (J_1 = 2,5, J_2 = 9) 1H (C*H*-OH) 3,53 s (large) 1H (OH) ; 2,89 d de q (J_d = 9, J_q = 7) 1H (>CH-COO) : 2 à 0,80 massif 18H dont CH_3-CH-CO à 1,26 d (J = 7).
Analyse $C_{25}H_{32}O_4$: Calc. % : C 75,72 H 8,13.
Tr : 75,78 8,30
Masse : M^+ = 396

Ester méthylique de l'acide hémibourgéanique *14*($C_{12}H_{24}O_3$)

A 0,090 g de l'acide *12* dissous dans 5 cm³ d'éther, on ajoute une solution éthérée de diazométhane jusqu'à coloration jaune du milieu, puis on abandonne une nuit à température ambiante La solution éthérée est ensuite lavée avec une solution de bicarbonate à 5 %, puis à l'eau jusqu'à neutralité, séchée sur sulfate de sodium et évaporée. On recueille

0,082 g d'ester méthylique *14* (Rdt : 85 %). Liquide, $[\alpha]^{23}_{D} = +6^{o}$ ($CHCl_3$, c = 1,07).
IR : ν_{OH} = 3520 cm^{-1} ; ν_{CO} = 1720-1735 cm^{-1}.
RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 3,70 s 3H (OCH_3) ; 3,63 d de d (J_1 = 3, J_2 = 8,5) 1H (C*H*OH) ; 3,12 s (large) 1H (OH) ; 2,68 d de q (J_d = 8,5, J_q = 7) 1H (>CH-CO) ; 1,90 à 0,80 massif 18H dont CH_3-CH-CO 1,15 d (J = 7).
Masse : M^+ = 216.

Décomposition thermique du sel de potassium de l'acide bourgéanique

Le sel de potassium de l'acide bourgéanique *8* (0,340 g) est placé dans le bouilleur d'un appareil à microdistillations et chauffé vers 260°C. Il fond et se décompose. Les vapeurs émises sont condensées et recueillies dans le récepteur (0,178 g).

Le distillat recueilli, analysé en chromatographie en phase vapeur renferme essentiellement deux produits, en proportions équivalentes. En couplant le chromatographe à un spectromètre de masse on observe pour le premier produit un ion moléculaire à m/e = 140 ($C_{10}H_{20}$) et pour le second un ion moléculaire à m/e = 128 ($C_8H_{16}O$).

Le mélange étant capable de décolorer une solution de fuschine (réactif de Schiff), on en déduit la présence d'un aldéhyde *15* qui ne peut être que le deuxième composé qui est oxygéné. En IR on observe des bandes d'absorption à 2710 et 1730 cm^{-1}, caractéristiques des vibrations CHO et CO d'un aldéhyde.

Le distillat est mis en solution dans 6 cm^3 d'éthanol. On ajoute 0,101 g de dinitro-2, 4 phénylhydrazine, une goutte d'acide chlorhydrique et on chauffe à ébullition pendant 5 mn. Par refroidissement, il cristallise 0,115 g de dinitro-2, 4 phénylhydrazone de l'aldéhyde diméthyl-2, 4 hexanoïque *16* en petites aiguilles jaune pâle F : 96-96,5°C (EtOH). $[\alpha]^{21}_{D} = -16,1^{o}$ ($CHCl_3$, c = 0,70).

Analyse $C_{14}H_{20}O_4N_4$: Calc. % : C 54,53 H 6,54.
Tr. % : 54,56 6,75.

IR : ν_{NH} = 3290 cm^{1-}, bandes à 1620, 1590, 1520, 1335, 1310 et 1265 cm^{-1}.
RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 9,15 d (J = 2,5) 1H ; 8,40 d de d (J_1 = 2,5, J_2 = 10) ; 8,00 d (J = 10) 1H (3H arom.) ; 7,55 m (4 signaux) 1H (CH = N) ; 2,68 m 1H (CH-C = N) ; 1,90 à 0,80 massif 15H.
Masse : M^+ = 308.

Le résidu de la distillation est acidifié par de l'acide phosphorique et distillé. Dans le distillat on caractérise l'acide propionique par ses spectres de masse et d'infrarouge.

Diméthyl-2, 4 hexanal *17* ($C_8H_{16}O$)

Dans un ballon tricol de 250 cm^3 refroidi extérieurement par un mélange glace-eau, équipé d'un réfrigérant ascendant muni d'une garde à chlorure de calcium, d'une ampoule à brome, d'un tube à barbotage à deux entrées et d'un système d'agitation, on place 50 cm^3 de tétrahydrofuranne anhydre. Puis on fait barboter du butène-2 jusqu'à dissolution de 18,7 g (0,33 M). On fait passer un courant d'azote sec pendant quelques minutes, puis on injecte au moyen d'une seringue 110 cm^3 d'une solution normale de borane dans du

tétrahydrofuranne (0,11 M BH_3). On porte le mélange à 40°C pendant 2 h 1/2 pour obtenir une formation complète du tributyl-2 borane. On ajoute alors 11,5 g (0,16 M) de méthyl-2 acroléine goutte à goutte et en refroidissant, car la réaction est exothermique. On ajoute enfin 2 cm³ d'eau et on agite pendant 10 mn à température ambiante. On chasse le solvant, distille sous pression réduite et on recueille la fraction bouillant à 63-65°C sous 17 mm Hg : 11 g de diméthyl-2,4 hexanal *17* (Rdt : 78 %).
IR : $\nu_{CHO} = 2710$ cm^{-1} ; $\nu_{CO} = 1730$ cm^{-1}.

Dinitro-2, 4 phénylhydrazone *18* ($C_{14}H_{20}O_4N_4$)

0,080 g de diméthyl-2,4 hexanal sont dissous dans 8 cm³ d'éthanol. On ajoute 0,131 g de dinitro-2,4 phénylhydrazine, une goutte d'acide chlorhydrique et on chauffe à ébullition pendant 5 mn. On obtient par refroidissement 0,164 g de dinitro-2,4 phénylhydrazone du diméthyl-2,4 hexanal en aiguilles jaune pâle. (Rdt : 86 %). F : 96-97°C (EtOH).

Les spectres IR et de RMN sont identiques à ceux de la DNPH *16* issue du produit naturel. Le point de fusion du mélange n'est pas abaissé.

Hydroxy-3 triméthyl-2, 4, 6 octanoate d'éthyle *19* ($C_{13}H_{26}O_3$)

Dans un ballon tricol de 500 cm³, muni d'un réfrigérant ascendant, d'une ampoule à brome et d'un agitateur, on place 2,73 g de zinc en poudre. 5,4 g de diméthyl-2, 4 hexanal *17* et 6,2 g de bromo-2 propionate d'éthyle sont dissous dans 80 cm³ de benzène anhydre additionné de 20 cm³ d'éther anhydre et versés dans l'ampoule à brome. On laisse passer 10 cm³ du mélange dans le ballon et on chauffe légèrement jusqu'à ce que la réaction débute. On arrête alors le chauffage, et on ajoute le reste du mélange à une vitesse telle que le reflux persiste et en évitant que l'ébullition ne devienne trop vigoureuse. L'addition terminée, on chauffe à doux reflux au bain-marie pendant 1/2 h.

On refroidit extérieurement le ballon avec un mélange glace-sel et on ajoute une solution aqueuse d'acide sulfurique (10 %) en agitant fortement. Le mélange réactionnel est ensuite extrait à l'éther ; la phase éthérée est lavée à l'eau jusqu'à neutralité, séchée sur du sulfate de sodium et évaporée. Le résidu est distillé sous pression réduite et on recueille la fraction bouillant à 102-104°C sous 1 mm Hg : 6,1 g (Rdt : 63 %), de hydroxy-3 triméthyl-2, 4, 6 octanoate d'éthyle racémique *19*.
IR : $\nu_{OH} = 3500$ cm^{-1} ; $\nu_{CO} = 1715$ et 1730 cm^{-1}.
RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 4,22 m 2H (OCH_2) ; 3,55 m 1H (C*H*OH) ; 2,60 m 1H (>CH-CO) ; 2 à 0,80 massif 21H (aliph.).
Masse : $M^+ = 230$.

Acide hydroxy-3 triméthyl-2, 4, 6 octanoïque racémique *20* ($C_{11}H_{22}O_3$)

3 g de l'ester *19* sont dissous dans 20 cm³ d'éthanol. On ajoute 10 cm³ d'une solution aqueuse de potasse à 20 % et on porte à ébullition douce pendant 45 mn. La solution est refroidie, acidifiée par de l'acide chlorhydrique dilué, puis extraite à l'éther. La phase éthérée, lavée à l'eau, séchée et évaporée, fournit 1,926 g d'acide racémique *20* (Rdt : 57 %).
IR : $\nu_{OH} = 3400$ cm^{-1} ; $\nu_{CO} = 1710$ cm^{-1}.

RMN ($CDCl_3$) : 7,00 s 2H (OH) ; 3,65 m 1H (C*H*OH) ; 2,65 m 1H (CHCO) ; 2 à 0,75 massif 18H (aliph.).
Masse : $M^+ = 202$.

Hydroxy-3 triméthyl-2, 4, 6 octanoate de méthyle racémique *21* ($C_{12}H_{24}O_3$)

L'acide hydroxy-3 triméthyl-2,4,6 octanoïque *20* (632 mg) est estérifié par une solution éthérée de diazométhane, à froid, en 12 h. La solution éthérée, après lavage au bicarbonate de sodium, puis à l'eau fournit 618 mg d'ester méthylique racémique *21* (Rdt : 91 %).
IR : $\nu_{OH} = 3500$ cm^{-1} ; $\nu_{CO} = 1720$ et 1735 cm^{-1}.
RMN (CCl_4) : δ (ppm) = 3,66 s 3H (OCH_3) ; 3,50 m 1H (C*H*OH) ; 2,55 m 1H (>CH-CO) ; 2 à 0,80 massif 18H (aliph.).
Masse : $M^+ = 216$.

Acide bourgéanique ($C_{22}H_{42}O_5$)

316 mg d'acide hémibourgéanique *12* sont dissous dans 7 cm³ d'éther anhydre, on ajoute 454 mg de dicyclohexylcarbodiimide et on agite le mélange à température ambiante pendant 20 h. Puis on filtre pour éliminer la cyclohexylurée formée. Le filtrat est évaporé à sec, puis repris par du pentane et filtré à nouveau.

La solution (pentane) est extraite par une solution de carbonate de sodium. La solution alcaline est acidifiée, puis extraite à l'éther. La solution éthérée évaporée fournit un résidu de 71,8 mg qui, est repris par de l'hexane, et laisse déposer lentement 44 mg d'acide bourgéanique (Rdt : 14 %), identique au produit naturel (F, spectres IR).

Méthyl-2 (diméthyl-1',3'pentyl)-3 propiolactone *22* ($C_{11}H_{20}O_2$)

A 231 mg d'acide hémibourgéanique *12* dissous dans 50 cm³ d'hexane, on ajoute 500 mg de carbonate de sodium anhydre et 500 mg de chlorure de méthane sulfonyle. Le mélange est agité pendant 24 h à température ambiante, puis on filtre pour séparer le solide minéral, le filtrat est lavé deux fois avec de l'hexane. La solution hexanique est concentrée sous vide, on obtient un résidu brut de 219 mg qui est distillé sous pression réduite pour fournir 125 mg de propiolactone *22*, liquide mobile. (Rdt : 59 %).
IR : $\nu_{CO} = 1825$ cm^{-1}.
RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 3,86 d de d 1H (H_β) ($J_{H\alpha H\beta} = 4$, $J_{H\beta H\gamma} = 8$) ; 3,25 d de q 1H (H_α) ($J_{H\alpha H\beta} = 4$, $J_{H\alpha CH_3} = 7{,}5$) ; 2,10 à 1,85 massif 18H ; 1,38 3H (CH_3-2) d ($J_{H\alpha CH_3} = 7{,}5$).
Masse : $M^+ = 184$.

Lactide *23* ($C_{22}H_{40}O_4$)

549 mg d'acide bourgéanique *1* sont dissous dans 10 cm³ d'anhydride acétique et 15 cm³ de pyridine anhydre et le mélange est porté à ébullition douce pendant 1 h ; puis on ajoute de l'eau et extrait à l'éther. La solution éthérée est lavée deux fois à l'eau, puis deux fois avec une solution de sulfate de cuivre et enfin une fois à l'eau. Elle est ensuite extraite au moyen d'une solution de bicarbonate de sodium et lavée à l'eau jusqu'à neutralité, on obtient une solution alcaline S.

La fraction neutre obtenue par évaporation de l'éther fournit 86 mg du lactide *23* (Rdt : 16 %). Si on traite l'acide bourgéanique dans les mêmes conditions, mais à froid pendant 24 h, le rendement en lactide *23* est porté à 53 %. Solide fondant à 77°C (EtOH, H_2O). $[\alpha]_D^{23} = +56°$ ($CHCl_3$, c = 1,21).
IR : $\nu_{CO} = 1745$ cm^{-1}.
RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 4,85 d de d ($J_1 = 1,8$, $J_2 = 10$) 2H (>CH-O) ; 3,02 d de q ($J_d = 10$, $J_q = 6,5$) 2H (>CH-CO) ; 2,10 à 0,80 massif 36H.
Masse : $M^+ = 368$, le pic de base à m/e = 240 ($C_{14}H_{24}O_3$, Calc. 240,172, Tr. 240,171) est dû à la perte du groupe $C_8H_{16}O$ et peut être expliqué par le schéma suivant :

m/e = 240 (100%)

A 118,5 mg du lactide *23* dissous dans 5 cm³ d'éthanol on ajoute 4 cm³ d'une solution de potasse à 15 % et on chauffe le mélange à doux reflux pendant 45 mn. On refroidit ensuite, acidifie par de l'acide chlorhydrique et extrait à l'éther.

La phase éthérée séchée et évaporée fournit 115 mg d'un mélange renfermant 15 % d'acide α-éthylénique et 85 % d'acide hémibourgéanique, dont le spectre de RMN est identique à celui de *12*.

Acide triméthyl-2, 4, 6 octène-2 oïque *24* ($C_{11}H_{20}O_2$)

La solution alcaline S précédente est acidifiée, puis extraite à l'éther. La solution éthérée est lavée à l'eau et évaporée pour fournir 372 mg d'une huile qui est chromatographiée sur colonne de gel de silice (éluant : hexane-acétone, 85/15) pour donner 318 mg de l'acide *24* (Rdt : 61 %).
IR : $\nu_{CO} = 1690$ cm^{-1} ; $\nu_{C=C} = 1645$ cm^{-1}.
RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 6,72 d de q ($J_d = 10$, $J_q = 1,5$) 1H (-CH =) ; 2,70 m 1H (H_γ) ; 1,85 d (J = 1,5) 3H (CH_3-C =) ; 1,50 à 0,70 massif 14H (aliph.).
Masse : $M^+ = 184$.

Son ester méthylique, obtenu par action du diazométhane, est un liquide. En infrarouge on obtient : $\nu_{CO} = 1717$ cm^{-1} ; $\nu_{C=C} = 1650$ cm^{-1}.

Formiate de l'acide hémibourgéanique *25* ($C_{12}H_{22}O_4$)

On porte à reflux pendant 5 h une solution de 763 mg d'acide bourgéanique *1* dans 25 cm³ d'acide formique. Par évaporation sous pression réduite de l'excès d'acide formique, on recueille 893 mg d'ester formique de l'acide hémibourgéanique (liquide) (Rdt : 98 %).
IR : $\nu_{CO} = 1742$ et 1725 cm^{-1}.
RMN ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 9,70 s 1H (COOH) ; 8,10 s 1H (—HCO) ; 5,16 d de d (J = 2,5 et 9) 1H (>CH-OCO) ; 2,83 m 1H (>CH-CO) ; 2,10 à 0,70 massif 18H dont CH_3-2 à 1,16 d (J = 7).

Ce formiate est pyrolisé vers 200°C et on recueille le distillat : 0,594 mg d'acide α-éthylénique *24*, qui est caractérisé par ses spectres infrarouge et de RMN.

Acide triméthyl-2, 4, 6 octanoïque *26* ($C_{11}H_{22}O_2$)

L'acide triméthyl-2,4,6 octène-2 oïque *24* (280 mg), dissous dans l'éthanol, est hydrogéné à température ambiante et pression normale en présence de Pd/C à 10 % comme catalyseur. L'acide saturé obtenu *26* est converti, par action du diazométhane, en son ester méthylique *27* (256 mg), qui a été purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (éluant : hexane), liquide mobile ; Rdt : 84 %. $[\alpha]_D^{22} = -11{,}0°$ ($CHCl_3$, c = 1,08).
IR : ν_{co} = 1744 cm^{-1} ; Masse : M^+ = 200 ($C_{12}H_{24}O_2$).

Triméthyl-2, 4, 6 octanoate de méthyle racémique *28* ($C_{12}H_{24}O_2$)

464 mg d'acide hydroxy-3 triméthyl-2, 4, 6 octanoïque racémique *21* sont dissous dans 15 cm^3 d'un mélange d'anhydride acétique et de pyridine (1/3). Le tout est porté à douce ébullition pendant 2 h, puis est refroidi et jeté sur de la glace. La solution aqueuse est acidifiée, puis extraite à l'éther. La phase éthérée évaporée fournit 368 mg d'acide triméthyl-2, 4, 6 octène-2 oïque racémique (Rdt : 87 %). 345 mg de ce produit sont dissous dans 20 cm^3 d'éthanol et hydrogénés en présence de catalyseur (Pd/C à 10 %). Après filtration et évaporation du solvant, on recueille 344 mg d'acide triméthyl-2, 4, 6 octanoïque racémique brut.

Cet acide est dissous dans l'éther et traité par une solution éthérée de diazométhane (10 h à froid). La solution éthérée est lavée avec une solution de bicarbonate de sodium (7 %) et 3 fois à l'eau, séchée sur du sulfate de sodium et évaporée. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur une courte colonne d'alumine (éluant : hexane). On obtient ainsi 278 mg de triméthyl-2, 4, 6 octanoate de méthyle racémique *28* (Rdt : 74 %).
IR : ν_{co} = 1744 cm^{-1} (le spectre est semblable à celui de l'ester *27*).
Masse : M^+ = 200 (spectre identique à celui de *27*).

Les esters *27* et *28* sont analysés comparativement par chromatographie en phase vapeur sur colonne capillaire Golay, phase stationnaire LB-550-X (polypropylène glycol), longueur 50 m, diamètre 0,25 mm. Pression d'azote 2 bars.

Incorporation d'acétate de sodium (1-^{14}C)

Conditions de culture

Le Lichen *Desmaziera evernioides* (11,7 g) récolté depuis 2 jours, est placé dans un erlenmeyer de 500 cm^3. On ajoute 150 cm^3 d'une solution nutritive stérile (Czapek-Dox : $NaNO_3$ 2,0 g — K_2HPO_4 1,0 g — $MgSO_4$, 7 H_2O 0,5 g — KCl 0,5 g — $FeSO_4$, 7H_2O 0,01 g — Glucose 50 g — H_2O 1000 cm^3).

Après addition de 0,1 mCi d'acétate de sodium (1-^{14}C) (activité spécifique 55 mCi/mM, solution aqueuse stérile, 0,2 ml) on agite mécaniquement le Lichen pendant 48 h à 30°C, sous illumination (2 lampes de 100 W à 30 cm).

Isolement de l'acide bourgéanique et résultats

Le Lichen est filtré sur buchner, lavé 7 fois à l'eau et essoré, puis est séché à l'air pendant 3 jours. On recueille 10,74 g de Lichen qui sont broyés et extraits au Soxhlet pendant 3 h par de l'acétone. L'extrait acétonique fournit 421,8 mg d'un solide jaunâtre qui est recristallisé dans l'hexane après filtration, puis est repris par du méthanol, traité par du noir végétal puis recristallisé dans le méthanol-eau (50/50) pour donner l'acide bourgéanique F = 125-126°C. On recristallise plusieurs fois l'acide bourgéanique dans ce mélange méthanol-eau, en opérant à chaque fois des prélèvements pour mesurer la radioactivité.

Les échantillons radioactifs sont dissous dans le toluène scintillant préparé comme décrit dans la référence (**98**). Le rendement varie de 82 à 86 %. Les activités spécifiques sont exprimées en désintégrations par minute et par milligramme (dpm/mg) ou par millimole (dpm/mM).

La radioactivité de l'acide bourgéanique isolé dans cette expérience est constante dès la deuxième recristallisation. On observe une activité de 8000 dpm-mg, soit 3,088 10^6 dpm/mM. La quantité d'acide bourgéanique isolée est estimée à 324 mg. Le pourcentage d'incorporation est de 1,17 % et la valeur de dilution de 3,96 10^4.

Incorporation de propionate de sodium (1-^{14}C)

On opère comme dans le cas décrit précédemment. On utilise 12,5 g de Lichen et 0,1 mCi de propionate de sodium (1-^{14}C) (activité spécifique : 37,4 mCi/mM). On recueille 9,3 g de Lichen qui fournissent 370 mg d'extrait brut.

Après la première cristallisation on observe une marque faible qui diminue lentement après chaque nouvelle recristallisation dans le mélange méthanol-eau. Pour accélérer sa purification on transforme l'acide bourgéanique en son sel de potassium qu'on purifie, puis on régénère l'acide. On mesure après treize recristallisations une activité de 116 dpm/mg soit 4,47 10^4 dpm/mM. La quantité d'acide bourgéanique isolée est estimée à 279 mg, le pourcentage d'incorporation est de 0,01 % et la valeur de dilution est 1,86 10^6.

Incorporation de L-méthionine (CH_3-^{14}C)

On utilise 12,2 g de Lichen frais et 0,1 mCi de (CH_3-^{14}C) méthionine (activité spécifique 53 mCi/mM). On recueille 7 g de Lichen sec. Ils fournissent 343 mg d'extrait brut qui sont purifiés de la manière décrite précédemment.

Dès la 2e cristallisation l'activité de l'acide bourgéanique isolé reste constante et a une valeur de 120000 dpm/mg, soit 4,63.10^7 dpm/mM. La quantité d'acide bourgéanique marqué est estimée à 210 mg. Le pourcentage d'incorporation est de 11,33 % et la valeur de dilution est de 2,54.10^3.

L'acide bourgéanique marqué est dilué environ 10 fois avec de l'acide bourgéanique inerte. On obtient ainsi un acide possédant une activité de 1,18.10^4 dpm/mg, soit 4,55.10^6 dpm/mM.

Fragmentation de l'acide bourgéanique radioactif

Réaction de Kuhn-Roth

L'acide bourgéanique provenant de l'expérience réalisée avec la méthionine est dégradé suivant la méthode de Kuhn-Roth.

89,9 mg d'acide bourgéanique ($1,18.10^4$ dpm/mg), en présence de 5 g de CrO_3 dans 12,5 cm³ d'eau, sont chauffés au reflux de l'eau et sous courant d'azote pendant 7 h, puis on laisse reposer à froid une nuit. On distille durant 1 h 30 en neutralisant au fur et à mesure le distillat par une solution de soude N/10 ; au cours de la distillation on ajoute au milieu huit fois 50 cm³ d'eau distillée et bouillie. On utilise pour neutraliser le distillat 6,96 cm³ de soude N/10. L'acide acétique formé est isolé sous forme de son *para*-phénylphénacylate.

Préparation du p-phénylphénacylate de l'acide acétique

L'acétate de sodium recueilli (0,696 mM) est dissous dans 10 cm³ d'eau : on ajoute une goutte d'une solution de phénolphtaléine et des traces d'acide chlorhydrique pour décolorer la solution. On ajoute alors une solution de 195 mg de bromure de *p*-phénylphénacyle dans 20 cm³ de méthanol et on porte le tout à reflux pendant 2 h 30. On refroidit, ajoute de l'eau et filtre le précipité formé (162 mg), il s'agit d'un mélange de plusieurs produits qui sont séparés par chromatographie sur plaque de gel de silice avec pour éluant : acétate d'éthyle-éther de pétrole, 25/75.

154 mg du mélange fournissent ainsi 58,6 mg de *p*-phénylphénacylate de l'acide acétique (Rf : 0,22). Il possède une marque de $2,26.10^3$ dpm/mg, soit $5,74.10^5$ dpm/mM, c'est-à-dire 100,9 % de la marque théorique ($5,69.10^5$ dpm/mM).

Toute la radioactivité était donc localisée dans les méthyles.

Régénération de l'acide acétique

41,9 mg ($2,26.10^3$ dpm/mg) du p-phénylphénacylate de l'acide acétique sont dilués avec du dérivé inerte ; on obtient un dérivé de l'acide acétique ayant une marque de 5,66 dpm/mg, soit $1,44.10^5$ dpm/mM. 166 mg de ce dérivé sont dissous dans le méthanol et placés dans un ballon. On ajoute une solution de 2 g de potasse dans 15 cm³ de méthanol (après filtration pour éliminer le carbonate de K) et 10 cm³ d'eau bouillie. On chauffe à reflux pendant 1 h 30. Puis on acidifie le milieu (H_3PO_4) et on distille l'acide acétique qui est recueilli dans une solution de soude N/10. (On a vérifié auparavant que l'acide qui distille dans ces conditions est bien l'acide acétique, en le caractérisant par son dérivé phénacylé lors d'un essai à blanc).

On recueille ainsi 28,2 mg d'acétate de sodium.

Réaction de Schmidt sur l'acide acétique

L'acétate de sodium radioactif (28,2 mg) est dissous dans un peu de méthanol et placé dans le tube A de I (cf. fig. 15). Après avoir chassé le solvant, on ajoute 50 mg de NaN_3 et 0,3 cm³ de H_2SO_4 concentré dans le tube B. On fait le vide dans le récipient en se servant du robinet II, puis en basculant soigneusement on fait passer l'acide sulfurique dans le tube A. Une réaction vive a lieu aussitôt. On chauffe le récipient I pendant 1 h au bain-marie à 80°C. Puis on remplit III avec environ 10 cm³ d'une solution de $Ba(OH)_2$ décarbonatée. On fait le vide par le robinet II et on chauffe à l'air. On met en communication I et III par le robinet II et le CO_2 est précipité en $BaCO_3$.

On centrifuge le précipité, on décante l'excès de baryte, puis on lave quatre fois à l'eau distillée et fraîchement bouillie le carbonate, ensuite une fois au méthanol et une fois à l'acétone. Après séchage sous vide, on obtient 24,8 mg de carbonate de baryum.

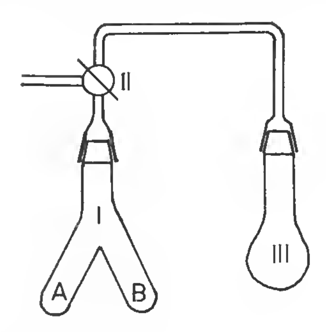


Fig. 15. — Appareil utilisé pour la réaction de Schmidt.

Activité du carbonate de baryum

Le carbonate de baryum est traité par une solution d'acide citrique 3 N et le CO_2 libéré est entraîné par un léger courant d'azote dans un mélange cyclohexylamine-méthanol (1 cm^3/0,5 cm^3 pour 5 mg de carbonate). Après deux heures, ce mélange est transféré dans une fiole de comptage ainsi que le mélange de rinçage du barboteur (0,5 cm^3 de cyclohexylamine et 1 cm^3 de méthanol). Le tout est compté dans le toluène scintillant.

On opère sur 6,24 mg de carbonate de baryum et on trouve une activité de 20,05 cpm. (Le toluène scintillant possède une activité de 19,75 cpm.)

Activité de la méthylamine formée dans la réaction de Schmidt

On utilise l'appareil décrit précédemment. La méthylamine formée lors de la réaction de Schmidt est restée dans le tube A sous forme de sulfate.

On place dans le tube B une solution concentrée de potasse et dans le récipient III 101 mg de chloro-1 dinitro-2,4 benzène et 64 mg d'acétate de sodium anhydre en solution éthanolique.

On fait le vide dans l'ensemble de l'appareil au moyen du robinet II, puis en basculant on fait passer la solution de potasse dans le tube A pour libérer la méthylamine. Celle-ci est condensée dans le récipient III qui est refroidi extérieurement. Pour libérer complètement l'amine on chauffe au bain-marie le tube A. Puis on porte à reflux pendant une dizaine de minutes le récipient III. On le refroidit, ajoute de l'eau et filtre le précipité jaune formé. Celui-ci est lavé à l'eau et recristallisé dans l'éthanol. On obtient ainsi 5,3 mg de dinitro-2,4 phényl méthylamine, fondant à 176-177°C (Litt. 178°C).

L'activité observée est de 709,7 dpm/mg, soit $1,40.10^5$ dpm/mM, c'est-à-dire 97,2 % de l'activité théorique.

Structure cristalline de l'acide bourgéanique

COORDONNÉES (ORTHONORMÉES) DES ATOMES DE CARBONE ET D'OXYGÈNE

	x	y	z
O_1	7,0373	—1,1064	6,3621
O_2	5,5950	—0,5104	4,7866
C_1	6,6499	—0,3669	5,3159
C_2	7,6956	0,6765	4,9058
C_{21}	8,4768	0,1124	3,7153
C_3	6,9427	1,9721	4,4936
C_4	7,8258	3,1233	4,0327
C_{41}	8,8209	3,5983	5,1316
C_6	6,9827	4,2383	3,4593
C_5	6,3426	3,9639	2,1454
C_{61}	7,4447	4,2244	1,0258
C_7	5,2539	5,0232	1,8592
C_8	4,4629	4,6216	0,5977
O_1'	6,3208	2,4012	5,7989
O_2'	4,2362	2,4588	4,9241
C_1'	4,9738	2,5588	5,8786
C_2'	4,5431	2,7832	7,3110
$C_2'1$	4,7785	1,4680	8,1471
C_3'	5,3506	3,9710	7,9304
$O_3'1$	5,1192	5,1188	7,0721
C_4'	5,0598	4,2253	9,3618
$C_4'1$	3,5827	4,5920	9,6375
C_5'	5,9952	5,3633	9,9198
C_6'	7,4651	5,1428	9,7521
$C_6'1$	7,9094	3,8249	10,4503
C_7'	8,2536	6,3492	10,5200
C_8'	7,9741	7,6649	9,8602

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(**1**) W. Zopf, Die Flechtenstoffe in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung, G. Fischer, Jena, 1907.

(**2**) P. Ozenda et G. Clauzade, Les Lichens. Étude biologique et Flore illustrée, Masson et Cie, Paris, 1970.

(**3**) H. des Abbayes, Traité de Lichénologie, Lechevalier, Paris, 1951.

(**4**) C. Souchon, Les Lichens, Coll. Que Sais-je, Presses Univ. France, Paris, 1971.

(**5**) M. E. Hale jr, The Biology of Lichens, Edward Arnold, London, 1967.

(**6**) M. Fujikawa, *J. pharm. Soc. Japan*, 1939, **59** : 515.

(**7**) Y. Asahina et S. Shibata, Chemistry of lichen substances, Japan Soc. for the Promotion of Sci.. Tokyo, 1954.

(**8**) C. F. Culberson, Chemical and botanical guide to lichen products, Univ. North Carolina Press, Chapel Hill, 1969.

(**9**) C. F. Culberson, Supplement to Chemical and botanical guide to lichen products, *Bryologist*, 1970, **73** : 177-377.

(**10**) S. Huneck, Lichen substances. *In* : Progress in Phytochemistry, Ed. L. Reinhold et Y. Liwschitz, Intersci. Publ. J. Wiley and Sons, 1968.

(**11**) S. Huneck, Nature of Lichen substances, *In* : The Lichens, Ed. W. Ahmadjian et M.E. Hale, Acad. Press, New-York and London, 1973.

(**12**) K. Mosbach, Biosynthesis of lichen substances, *In* : The Lichens, Ed. W. Ahmadjian et M. E. Hale, Acad. Press, New-York and London, 1973.

(**13**) R. G. Werner, cité par Ozenda (**2**).

(**14**) B. Bodo, P. Hebrard, L. Molho et D. Molho, *Tetrahedron Lett.*, 1973 : 1631.

(**15**) B. Lindberg, *Acta chem. scand.*, 1955, **9** : 917.

(**16**) Y. J. Solberg, *Acta chem. scand.*, 1957, **11** : 1477.

(**17**) G. Trotet, Précis de Lichénologie, N. Boubée et Cie, Paris, 1968.

(**18**) F. H. Curd et A. Robertson, *J. chem. Soc.*, 1937 : 894.

(**19**) D. H. R. Barton et T. Bruun, *J. chem. Soc.*, 1953 : 603.

(**20**) Y. Asahina et J. Asano, *Ber.*, 1933, **66** : 891, 1031 et 1215.

(**21**) S. Huneck et G. Follmann, *Willdenowia*, 1969, **5** : 181.

(**22**) S. Huneck, Communication personnelle.

(**23**) L. Breton-Funes, Communication personnelle.

(**24**) A. W. Evans, *Trans. Conn. Acad. Arts Sci.*, 1944, **35** : 519.

(**25**) C. F. Culberson, Communication personnelle.

(**26**) E. Dahl, *Revue bryol. lichen.*, 1952, **21** : 119.

(**27**) T. Bruun, *Acta chem. scand.*, 1973, **27** : 3120.

(**28**) S. A. Fiscus, *Bryologist*, 1972, **75** : 299.

(**29**) H. R. Schulten et H. D. Beckey, Advances in Mass Spectrometry, vol. 6, Applied Sci. Publ., Barking, 1974.

(**30**) H. Budzikiewicz, C. Djerassi et D. H. Williams, Structure elucidation of natural products by mass spectrometry, vol. 2, Holden-Day Inc., San Francisco, London, Amsterdam, 1954.

(**31**) N. C. Franca et J. Polonsky, *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 1971, **273** : 439. Sér. C.
(**32**) A. H. Etemadi, Thèse de Doctorat d'État, Paris, 1965.
(**33**) R. Ryhage et E. Stenhagen, *Ark. Kem.*, 1960, **15** : 545.
(**34**) H. Schnapp, *Ann. Chem.*, 1880, **201** : 62.
(**35**) M. Effrussi et S. Reformatsky, *J. Soc. phys.-chim. russe*, 1896, **28** : 600.
(**36**) O. Wallach, *Ann. Chem.*, 1909, **365** : 255.
(**37**) J. Asselineau et E. Lederer, *Nature*, 1950, **166** : 782.
(**38**) O. Wallach, *Ann. Chem.*, 1912, **389** : 189.
(**39**) F. G. Fischer et K. Lowenberg, *Ber.*, 1933, **66** : 669.
(**40**) C. Djerassi et S. D. Sample, *Nature*, 1965, **208** : 1314.
(**41**) J. Seibl et J. Vollmin, *Org. Mass Spectrom.*, 1968, **1** : 713.
(**42**) R. J. Liedtke, A. M. Duffield et C. Djerassi, *Org. Mass Spectrom.*, 1970, **3** : 1089.
(**43**) D. Goldsmith et C. Djerassi, *J. org. Chem.*, 1966, **31** : 3661.
(**44**) J. Seibl, *Org. Mass Spectrom.*, 1970, **3** : 417.
(**45**) D. M. Grant et E. G. Paul, *J. Am. chem. Soc.*, 1964, **86** : 2984.
(**46**) L. P. Lindeman et J. Q. Adams, *Analyt. Chem.*, 1971, **43** : 1245.
(**47**) J. D. Roberts, F. J. Weigert, J. I. Kroschwitz et H. J. Reich, *J. Am. chem. Soc.*, 1970, **92** : 1338.
(**48**) L. M. Jackman et D. P. Kelly, *J. chem. Soc.*, sect. B, 1970 : 102.
(**49**) R. Hagen et J. D. Roberts, *J. Am. chem. Soc.*, 1969, **91** : 4504.
(**50**) H.C. Brown, G.W. Kabalka, M.W. Rathke et M.M. Rogic, *J. Am. chem. Soc.*, 1968, **90** : 4165.
(**51**) L. Coles et N. Polgar, *J. chem. Soc.*, sect. C, 1968 : 1412.
(**52**) J. Canceill, J. J. Basselier et J. Jacques, *Bull. Soc. chim.*, 1967 : 1024.
(**53**) M. U. S. Sultanbawa, *Tetrahedron Lett.*, 1968 : 4569.
(**54**) W. Adam et C. I. Rojas, *Synthesis*, 1972, **4** : 616.
(**55**) W. Adam, J. Baeza et J. C. Liu, *J. Am. chem. Soc.*, 1972, **94** : 2000.
(**56**) R. J. Abraham, *J. chem. Soc.*, sect. B, 1968 : 173.
(**57**) B. Hallgren, R. Ryhage et E. Stenhagen, *Acta chem. scand.*, 1959, **13** : 845.
(**58**) W. K. Rohwedder, A. F. Mabrouk et E. Silke, *J. phys. Chem.*, 1965, **69** : 1711.
(**59**) T. M. Groff, H. Rakoff et R. T. Holman, *Ark. Kem.*, 1967, **29** : 179.
(**60**) U. E. Matter, C. Pascual, E. Pretsch, A. Pross, W. Simon et S. Sternhell, *Tetrahedron*, 1969, **25** : 691.
(**61**) D. Davoust, communication personnelle.
(**62**) G. Odham, *Ark. Kem.*, 1965, **23** : 431.
(**63**) J. Guilhem, à paraître.
(**64**) C. Riche, *Acta crystallogr.*, sect. A, 1973, **29** : 133.
(**65**) F. G. Jarvis et M. J. Johnson, *J. Am. chem. Soc.*, 1949, **71** : 4124.
(**66**) N. Polgar et R. Robinson, *Chem. Ind.* 1951 : 685.
(**67**) T. Sassa, T. Takemura, M. Ikeda et Y. Miura, *Tetrahedron Lett.*, 1973 : 2333.
(**68**) D. J. Aberhart, K. H. Overton et S. Huneck, *J. chem. Soc.*, sect. C, 1970 : 1612.
(**69**) K. Mosbach, *Angew. Chem.*, 1969, **81** : 233.

(**70**) H. Umezawa, T. Takeuchi et A. Ozaki, Japan. Kokai 73 61.690 (C.A., **80**, 2315g, 1974).
(**71**) K. Aghoramurty et T. R. Seshadri, *J. scient. ind. Res.*, New Delhi, 1954, **13**A : 114.
(**72**) R. Robinson, Structural relations of natural Products, Oxford Press, 1955.
(**73**) J. N. Collie, *J. chem. Soc.*, 1907, **91** : 1806.
(**74**) A. J. Birch et F. W. Donovan, *Aust. J. Chem.*, 1953, **6** : 360.
(**75**) A. J. Birch, R. A. Massy-Westropp et C. J. Moye, *Aust. J. Chem.*, 1955, **8** : 539.
(**76**) K. Mosbach, *Acta chem. scand.*, 1960, **14** : 457.
(**77**) P. K. Stumpf, *Annual Rev. Biochem.*, 1960, **29** : 261.
(**78**) K. Mosbach, *Acta chem. scand.*, 1964, **18** : 329.
(**79**) S. Shibata, M. Yamasaki et M. Matsuo, *Chem. pharm. Bull.*, Tokyo, 1965, **13** : 1015.
(**80**) Y. Asahina et M. Hiraiwa, *Ber.*, 1937, **70** : 1826.
(**81**) Y. Asahina et F. Fuzikawa, *Ber.*, 1934, **67** : 163.
(**82**) S. Huneck, *Z. Naturf.*, 1971, **26**b, : 1357.
(**83**) M. Yamasaki et S. Shibata, *Chem. pharm. Bull.*, Tokyo, 1966, **14** : 96.
(**84**) Traité de Biochimie générale, sous la direction de M. Javillier et Coll., Masson et C[ie], Paris, tome III, fasc. 2, 1969.
(**85**) J. J. Saz et A. Weil, *J. biol. Chem.*, 1960, **235** : 914 ; et *ibid.*, 1962, **237** : 2053.
(**86**) M. Gastambide-Odier, J. M. Delaumeny et E. Lederer, *Biochim. biophys. Acta*, 1963, **70** : 670.
(**87**) R. E. Noble, R. L. Stjernholm, D. Mercier et E. Lederer, *Nature*, 1963, **199** : 600.
(**88**) Étude en cours avec M. Meyer-Dayan et D. Molho.
(**89**) E. Lederer, *Quart. Rev.*, 1969, **23** : 453.
(**90**) J. W. Lennarz, G. Scheuerbrandt et K. Bloch, *J. biol. Chem.*, 1962, **237** : 664.
(**91**) G. Jaureguiberry, J. H. Law, J. A. Mc Closkey et E. Lederer, *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 1964, **258** : 3587.
(**92**) G. Jaureguiberry, M. Lenfant, B. C. Das et E. Lederer, *Tetrahedron*, suppl. 1966, **8** : 27.
(**93**) B. Bodo, D. Molho et J. Polonsky, *Tetrahedron Lett.*, 1974 : 1443.
(**94**) D. J. Aberhart, A. Corbella et K. H. Overton, *Chem. Comm.*, 1970 : 664.
(**95**) T. Bruun, *Acta chem. scand.*, 1971, **25** : 2831.
(**96**) K. Mosbach et I. Bavertoft, *Acta chem. scand.*, 1971, **25** : 1931.
(**97**) M. E. Hale jr, *Israel J. Bot.*, 1966, **15** : 150.
(**98**) G. Kunesch et J. Polonsky, *Phytochemistry*, 1969, **8** : 1221.

Manuscrit déposé le 23 juin 1975.

Bull. Mus. natn. Hist. nat., Paris, 3[e] sér., n[o] 348, nov.-déc. 1975, Sciences physico-chimiques 6 : 23-97.

Achevé d'imprimer le 27 février 1976.

IMPRIMERIE NATIONALE

5 564 004 5

Recommandations aux auteurs

Les articles à publier doivent être adressés directement au Secrétariat du *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle*, 57, rue Cuvier, 75005 Paris. Ils seront accompagnés d'un résumé en une ou plusieurs langues. L'adresse du Laboratoire dans lequel le travail a été effectué figurera sur la première page, en note infrapaginale.

Le *texte* doit être dactylographié à double interligne, avec une marge suffisante, recto seulement. Pas de mots en majuscules, pas de soulignages (à l'exception des noms de genres et d'espèces soulignés d'un trait).

Il convient de numéroter les *tableaux* et de leur donner un titre ; les tableaux compliqués devront être préparés de façon à pouvoir être clichés comme une figure.

Les *références bibliographiques* apparaîtront selon les modèles suivants :

Bauchot, M.-L., J. Daget, J.-C. Hureau et Th. Monod, 1970. — Le problème des « auteurs secondaires » en taxionomie. *Bull. Mus. Hist. nat., Paris*, 2e sér., **42** (2) : 301-304.

Tinbergen, N., 1952. — The study of instinct. Oxford, Clarendon Press, 228 p.

Les *dessins* et *cartes* doivent être faits sur bristol blanc ou calque, à l'encre de chine. Envoyer les originaux. Les *photographies* seront le plus nettes possible, sur papier brillant, et normalement contrastées. L'emplacement des figures sera indiqué dans la marge et les légendes seront regroupées à la fin du texte, sur un feuillet séparé.

Un auteur ne pourra publier plus de 100 pages imprimées par an dans le *Bulletin*, en une ou plusieurs fois.

Une seule épreuve sera envoyée à l'auteur qui devra la retourner dans les quatre jours au Secrétariat, avec son manuscrit. Les « corrections d'auteurs » (modifications ou additions de texte) trop nombreuses, et non justifiées par une information de dernière heure, pourront être facturées aux auteurs.

Ceux-ci recevront gratuitement 50 exemplaires imprimés de leur travail. Ils pourront obtenir à leur frais des fascicules supplémentaires en s'adressant à la Bibliothèque centrale du Muséum : 38, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, 75005 Paris.


MUSEUM
NATIONAL
D'HIST.NAT.